



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH  
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES

**Projet de Fin d'Etudes**

Licence Sciences & Techniques

Biotechnologie et Valorisation des Phyto-Ressources

**Evaluation in vitro de l'activité  
antimicrobienne des extraits de  
*Ziziphus lotus***

Présenté par: Aymane BESSI

Encadré par: Pr. Lahsen EL GHADRAOUI

Soutenu le: 08/06/2017

Devant le jury composé de:

- Pr. Lahsen EL GHADRAOUI : Encadrant
- Pr. Karima MIKOU : Examinterice
- Pr. El Hassan EL HARCHLI : Examinateur

Année universitaire 2016/2017



## **DEDICACES**

*Je dédie ce travail aux êtres les plus chers qui sont mes parents.*

*Ma mère pour son affection, sa patience, sa compréhension, son écoute et son soutien.*

*Mon père pour être mon plus haut exemple de persévérance pour aller toujours de l'avant et ne jamais baisser les bras.*

*A mon petit frère que je lui souhaite du succès et de la bonne vie.*

*A tous mes collègues de promotion 2016/2017 de License « Biotechnologie et Valorisation des Phyto Ressources (BVPR) ».*

*A tous les membres du laboratoire d'Ecologie Fonctionnelle et Environnement EFE*

*A toute ma famille et amis.*

*Et à toute autre personne que j'ai involontairement oublié de citer.*

## **REMERCIEMENTS**

*Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué au succès de mon stage et qui m'ont aidé lors de la rédaction de ce rapport.*

*Tout d'abord, j'adresse mes remerciements à mon cher professeur, **El GHADRAOUI Lahsen** de la Faculté des Sciences et Techniques de Fès, qui m'a beaucoup aidé dans ma recherche de stage. Son écoute et ses conseils m'ont permis de bien organiser mon travail au quotidien, et je suis reconnaissant pour sa bonne humeur, son dévouement, son temps accordé, et surtout pour l'opportunité d'effectuer mon stage au sein de son laboratoire d'Ecologie Fonctionnel et Environnement EFE, ce qui m'a permis de découvrir le monde de la recherche et la connaissance de nouvelles personnes.*

*Je tiens aussi à remercier le Professeur **MIKOU Karima** et le Professeur **El Hassan EL HARCHLI** qui ont accepté de sacrifier une partie de leur temps pour juger ce travail.*

*Je tiens à remercier vivement, **Dr. RAIS Chaimae**, Doctorante au sein du laboratoire d'Ecologie Fonctionnelle et Environnement à la Faculté des Sciences et Techniques de Fès, pour son encadrement, son aide, le partage de son expertise au quotidien et son temps accordé.*

*Je remercie également tous mes collègues du Laboratoire EFE pour leur esprit d'équipe et leur bonne humeur.*

*Enfin, je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont porté de l'aide durant toute ma vie pour en arriver là, ma famille et surtout mes parents et aussi mes amis.*

## RESUME

La présente étude a été initiée dans le but d'évaluer l'activité antimicrobienne de l'extrait éthanolique, méthanolique et aqueux de la pulpe de fruit de *Zizyphus lotus*. Le test a été effectué sur cinq souches microbiennes : *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus Faecalis* et *Candida Tropicalis*, en utilisant la technique des puits.

Les extraits ont montré une puissante activité sur les quatre souches bactériennes testées: *Escherichia Coli*, *Staphylococcus Aureus*, *Pseudomonas Aeruginosa* et *Enterococcus Faecalis*, alors que la souche fongique: *Candida Tropicalisa* montrée une résistance vis-à-vis des extraits étudiés. Les résultats obtenus ont montré aussi que la teneur maximale en polyphénols, flavonoïde et tanins a été enregistrée au niveau de l'extrait éthanolique et méthanolique, alors que la teneur la plus faible a été relevée chez l'extrait aqueux

Il ressort que les fruits de *Zizyphus lotus*, sont dotés d'un potentiel antibactérien important.

**Mots clés:** Activité antimicrobienne; *Zizyphus lotus*; Extraits; Polyphénols; Flavonoïdes; Tanins.

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

**C.T** : *Candida Tropicalis*

**E.A** : Extrait Aqueux

**E.C** : *Escherichia Coli*

**E.E** : Extrait Ethanolique

**E.F** : *EnterococcusFaecalis*

**E.M** : Extrait Méthanolique

**LB** : Luria Broth

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**P.A** : *Pseudomonas Aeruginosa*

**S.A** : *Staphylococcus Aureus*

**YPG** : Yeast Peptone Glucose

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1:</b> Structure de base des flavonoïdes.....	<b>4</b>
<b>Figure 2:</b> Aspects morphologiques des cinq souches étudiées.....	<b>8</b>
<b>Figure 3:</b> Extraction par Soxhlet.....	<b>9</b>
<b>Figure 4:</b> Evaporation du solvant par rotavapor.....	<b>9</b>
<b>Figure 5:</b> Dosage des polyphénols.....	<b>10</b>
<b>Figure 6:</b> Dosage des Flavonoïdes .....	<b>11</b>
<b>Figure 7 :</b> Taux du rendement d'EA, EE et EM des fruits du <i>Ziziphus Lotus</i> .....	<b>13</b>
<b>Figure 8:</b> Zones d'inhibition chez <i>Staphylococcus Aureus</i> .....	<b>14</b>
<b>Figure 9 :</b> Zones d'inhibition chez <i>Escherichia Coli</i> .....	<b>14</b>
<b>Figure 10:</b> Zones d'inhibition chez <i>Enterococcus Faecalis</i> .....	<b>14</b>
<b>Figure 11 :</b> Zones d'inhibition chez <i>Pseudomonas Aeruginosa</i> .....	<b>15</b>
<b>Figure 12:</b> Zones d'inhibition chez <i>Candida Tropicalis</i> .....	<b>15</b>
<b>Figure 13 :</b> Courbe d'étalonnage d'acide gallique.....	<b>15</b>
<b>Figure 14 :</b> Teneur en polyphénols des extraits des fruits de <i>Z. lotus</i> .....	<b>16</b>
<b>Figure 15 :</b> Courbe d'étalonnage de la quercétine.....	<b>16</b>
<b>Figure 16 :</b> Teneur en flavonoïdes des extraits des fruits de <i>Z. lotus</i> .....	<b>17</b>
<b>Figure 17 :</b> Teneur en tanins des extraits des fruits de <i>Z. lotus</i> .....	<b>17</b>

## SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b> .....	1
<b>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
I. Généralités sur la plante étudiée ( <i>Ziziphus Lotus</i> ).....	2
1. Description botanique.....	2
2. Classification.....	2
3. Utilisation thérapeutique.....	2
II. Métabolites secondaires.....	3
1. Polyphénols.....	3
2. Flavonoïdes.....	4
3. Tanins.....	4
3.1 Tanins hydrolysables.....	4
3.2 Tanins condensés.....	5
III. Activité antimicrobienne.....	5
1. Activité antibactérienne des extraits de plante.....	5
1.1 <i>Escherichia Coli</i> .....	5
1.2 <i>Staphylococcus Aureus</i> .....	6
1.3 <i>Pseudomonas Aeruginosa</i> .....	6
1.4 <i>EnterococcusFaecalis</i> .....	6
2. Activité antifongique des extraits des plantes.....	6
<b>MATERIEL ET METHODES</b>	
1. Matériel végétal.....	8
2. Microorganismes testés.....	8
3. Préparation des extraits.....	9
4. Calcul du rendement des extraits.....	9
5. Dosage des métabolites des extraits.....	9
5.1 Dosage des polyphénols.....	10
5.2 Dosage des flavonoïdes.....	10
5.3 Dosage des tanins condensés.....	11
6. Test de l'activité antimicrobienne.....	11
<b>RESULTATS ET DISCUSSION</b>	
I- Résultats.....	13
1. Rendement des extraits.....	13

2. Activité antimicrobienne.....	13
3. Dosage des métabolites des extraits.....	15
3.1 Dosage des polyphénols.....	15
3.2 Dosage des Flavonoïdes.....	16
3.3 Dosage des tanins.....	17
II- Discussion.....	18
<b>CONCLUSION GENERALE.....</b>	<b>19</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>20</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>24</b>

## INTRODUCTION

Au cours de ces dernières années, la résistance microbienne a évolué jusqu'au point où elle constitue présentement un grand problème, dans le domaine de la santé publique, à l'échelle mondiale. Il n'y a que quelques agents antimicrobiens pouvant être utilisés contre certains pathogènes et ce nombre continue à diminuer. Effectivement, ce sont les microorganismes multi-résistants aux drogues qui sont difficiles à traiter. Par exemple, les pathogènes multi-résistants communs, tels que *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* démontrant une résistance contre la majorité des drogues.

Le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques a conduit de nombreux auteurs à s'investir dans la recherche de nouvelles molécules naturelles dotées d'activité antimicrobienne. Ces molécules recherchées doivent posséder diverses autres propriétés chimiques et utiliser de nouveaux mécanismes d'action contre ces microbes pathogènes (Rollinger *et al.*, 2004). Certaines plantes aromatiques et médicinales (PAM) constituent la source principale des molécules entrant dans la composition des médicaments pharmaceutiques (Yano *et al.*, 2006). En effet, les métabolites secondaires font et restent l'objet de nombreuses recherches, *in vivo* comme *in vitro*, notamment la recherche de nouveaux constituants naturels.

*Ziziphus lotus* étant l'un des PAM largement utilisée dans la médecine traditionnelle. En outre, elle présente un grand intérêt sur le plan nutritif, cosmétique et médicinal. Ses activités anti-inflammatoire, analgésique, antifongique et antidiabétique ont été largement soulignées (Abu-Zargaet *al.*, 1995; Abdel-Zaher *et al.*, 2005; Suksamrarn *et al.*, 2005). Les fruits de *Ziziphus lotus* sont très connus par leur richesse en alcaloïdes, en flavonoïdes, en stérols, en tanins et en saponines triterpénoïdes. Ces caractéristiques font de *Ziziphus lotus* ne plante de valeur universelle (Borgi et Chouchane, 2006).

En raison de valoriser les potentialités, que culminent les extraits de cette plante, que nous avons menés ce travail, en vue de mettre en évidence leur pouvoir antimicrobien et afin d'améliorer les recettes tradithérapeutes. D'où nous avons cherché à évaluer l'activité antimicrobienne des extraits éthanolique, méthanolique et aqueux de la pulpe de fruits de *Ziziphus lotus*, en utilisant cinq microbes pathogènes : *Escherichia Coli*, *Pseudomonas Aeruginosa*, *Staphylococcus Aureus*, *Enterococcus Faecalis* et *Candida Tropicalis*.

## I. Généralités

### 1. Description botanique

*Zizyphus lotus* (jujubier) est un arbuste fruitier, épineux appartenant à la famille des Rhamnacées (Rsaissi et Bouchache, 2002). Communément appelé en Afrique du Nord "Sedra". Elle forme des touffes, de quelques mètres de diamètres, pouvant atteindre 2m de haut. Ses feuilles sont courtement pétiolées, glabres, caduques alternées et ovales à marges entières. Les fleurs sont jaunes, pentamères et groupées en inflorescence cymeuses. Les fruits sont des drupes à noyaux soudés. Les différentes espèces du *Zizyphus* sont largement utilisées dans le traitement de certaines maladies comme : les maladies inflammatoires, les troubles digestives, la faiblesse, les affections du foie, l'obésité, les troubles urinaires, le diabète, les infections cutanées, la fièvre, la diarrhée et l'insomnie (Abu-Zarga et al., 1995, Abdel-Zaher et al., 2005; Suksamrarn et al., 2005).

### 2. Classification

Règne	Végétal
Embranchement	Spermatophytes
Sous-embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Ordre	Celastrales
Famille	Rhamnaceae
Genre	<i>Zizyphus</i>
Espèce	<i>Zizyphus Lotus</i>

### 3. Utilisation thérapeutique

Des recherches actuelles sur les différentes activités pharmacologiques de *Z.lotus* ont ressorti de nombreux effets, de grande importance pour la médecine moderne. Parmi ces effets, les plus importants sont :

#### Activité anti-inflammatoire

Les flavonoïdes et les saponines extraits de l'écorce des racines du *Z. lotus* ont montré une inhibition maximale de l'œdème chez les rats (Borgi et al., 2006).

### **Activité antibactérienne**

Les extraits éthanoliques et méthanoliques de la pulpe du *Z.lotus* ont montré une activité antimicrobienne sur différentes espèces de microorganismes telles que : *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Entrez-ococcus faecalis* et *Pseudomonas aeruginosa* (Rsaissi et al., 2013)

### **Autres activités**

Les fruits de *Zizyphus lotus* ont été décrits, comme adoucissant et entrent dans le traitement de la gorge et les irritations broncho-pulmonaires. De même, la poudre des feuilles sèches et des fruits est appliquée dans le traitement des furoncles (Borgi et al., 2007). En outre, l'écorce des racines de *Z.lotus* est utilisée dans la médecine traditionnelle comme traitement du diabète (Benammar, 2010).

## **II. Métabolites secondaires**

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités par les plantes autotrophes, ils sont divisés principalement, en trois grandes familles: Polyphénols, terpènes et alcaloïdes (Lutge et al., 2002 ; Abderrazak et Joël,2007).

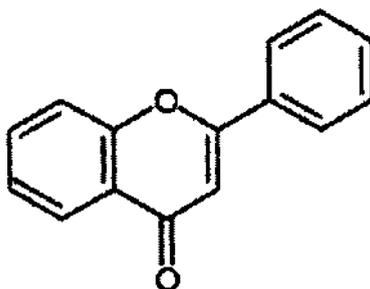
### **1. Polyphénols**

Les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux, caractérisés par la présence d'au moins, un noyau benzénique, auquel est directement, lié au moins un groupement hydroxyle libre, ou engagé dans une autre fonction tels que : éther, ester, hétéroside etc. (Bruneton, 1999 ; Lugasi et al., 2003). En effet, les composés phénoliques, constituent le groupe le plus nombreux et le plus largement distribué dans le royaume des végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliques connus (Lugasi et al., 2003). Les principales classes de composants phénoliques sont: les acides phénoliques (acide caféique, acide hydroxycinnamique, acide chlorogénique), les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols, les tanins, et les coumarines (King et Young, 1999 ; Tapiero et al., 2002). Les polyphénols sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs: racine, tiges, feuilles, fleurs et fruits (Boizot et Charpentier, 2006).

## 2. Flavonoïdes

Le terme flavonoïde désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols (Seyoum et *al.*, 2006), ils sont considérés comme des pigments quasiment universels des végétaux, souvent responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. À l'état naturel, les flavonoïdes se trouvent le plus souvent, sous forme d'hétérosides (Bruneton, 1999 ; Ghestem et *al.*, 2001).

Du point de vue structurale, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules, en effet, plus de 6400 structures ont été identifiées (Harborne et Williams., 2000).



**Figure 1:** Structure de base des flavonoïdes (Di Carlo et *al.*, 1999)

## 3. Tanins

Les tanins sont des substances polyphénoliques de structure variée, de saveur astringente ayant en commun, la propriété de tanner la peau, cette aptitude est liée à leur propriété de se combiner aux protéines. Leur poids moléculaire est compris entre 500 et 3000 Da (Paris et Hurabielle, 1981). On distingue habituellement, chez les végétaux supérieurs, deux groupes de tanins différents par leur structure, aussi bien que, par leur origine biogénétiques: Les tanins hydrolysables et les tanins condensés (Bruneton, 1999).

### 3.1 Tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables sont des polyesters de glucides et d'acides phénols, ils sont facilement scindés, par les enzymes de tannases, en oses et en acides phénols, selon la nature de celui-ci, on distingue : les tanins galliques et les tanins ellagiques (Paris et Hurabielle, 1981).

### 3.2 Tanins condensés

Les tanins condensés sont des polymères flavanoliques constitués d'unités flavan-3-ols, le plus souvent épicatechine et catéchine (Khanbabaeia et Ree, 2001). Les tanins condensés sont des molécules hydrolysables, leur structure voisine de celle des flavonoïdes est caractérisée par l'absence de sucre (Paris et Hurabielle, 1981).

## III. Activité antimicrobienne

Les bactéries sont des micro-organismes unicellulaires, classés parmi les procaryotes, car ils ne possèdent pas de membrane nucléaire. Ce caractère les distingue des autres organismes unicellulaires, classés parmi les eucaryotes (champignons, algues, protozoaires). Elles sont divisées en bactéries proprement dites (Bacteria) et bactéries primitives (Archaea). Toutes les bactéries rencontrées en pathologie, appartiennent aux Bacteria. Les bactéries ont généralement un diamètre inférieur à 1  $\mu\text{m}$ . On peut les voir au microscope optique, à l'état frais ou après coloration. Leur forme peut être sphérique (cocci), en bâtonnet (bacilles), incurvée (vibrions) ou spiralée (spirochètes). Les détails de leur structure ne sont visibles qu'en microscopie électronique (Nauciel et Vildé, 2005).

### 1. Activité antibactérienne des extraits des plantes

L'utilisation des antibiotiques conduit dans la très grande majorité des cas à la sélection de populations microbiennes résistantes. Cette résistance est due à des mutations chromosomiques, ou à l'acquisition de gènes de résistance, portés par des éléments génétiques mobiles (plasmides, phages, transposons, intégrons). Ces résistances ont conduit à chercher de nouveaux agents antimicrobiens, possédant une efficacité plus importante que les drogues synthétiques d'une part, et bien accepté par l'organisme d'autre part (sans exercer d'effets délétères sur la santé humaine) (García-Ruiz et *al.*, 2008 ; Kempf et Zeitouni, 2009).

#### 1.1 *Escherichia Coli*

*Escherichia coli* est un bacille à gram négatif (Patrick et *al.*, 1988), de forme non sporulée, de type anaérobie facultative, généralement, mobile grâce aux flagelles, sa longueur varie de 2 à 6  $\mu\text{m}$ , alors que sa largeur est de 1.1 à 1.5  $\mu\text{m}$  (Steven et *al.*, 2004). Les bactéries appartenant à l'espèce *E. Coli*, constituent la majeure partie de la flore microbienne aérobie du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux. Certaines souches sont virulentes, capables de déclencher spécifiquement chez l'homme, ou chez certaines espèces animales,

des infections spontanées des voies digestives ou urinaires ou bien encore des méningites néonatales. D'autres souches appartiennent à la flore commensale, peuvent être responsables d'infections opportunistes variées, surtout chez les sujets aux défenses immunitaires affaiblies (Patrick et *al.*, 1988).

### **1.2 *Staphylococcus Aureus***

*Staphylococcus aureus* sont des cocci à Gram positif, de forme sphérique, avec un diamètre de 0.8 à 1  $\mu\text{m}$ . Elles sont regroupés en diplocoques ou en petits amas (grappe de raisin). Ce type de bactéries sont immobiles, asporulés, habituellement sans capsule. De nombreuses souches de *Staphylococcus aureus* produisent un pigment jaune doré (Patrick et *al.*, 1988). *S. aureus* représente la cause de méningite, ostéomyélite et la diarrhée (Steven et *al.*, 2004).

### **1.3 *Pseudomonas Aeruginosa***

Les espèces *Pseudomonas aeruginosa* sont des bacilles à Gram négatif, ces bactéries fines sont de 1.5 à 3  $\mu\text{m}$  de long et 0.5 à 0.8  $\mu\text{m}$  de large. Elles sont mobiles grâce à une ciliature de type polaire monotriche, ce type de bactéries possède un aspect de « vol moucheron ». *P. aeruginosa* ne forme ni spores ni sphéroplastés. Elle est responsable de 10 % de l'ensemble des infections nosocomiales, occupant le troisième rang après *E. coli* et *S. aureus*, mais le premier rang pour les infections pulmonaires basses et le troisième rang pour les infections urinaires (Richard et Kiredjian, 1995).

### **1.4 *Enterococcus. Faecalis***

Les espèces du genre *Enterococcus* sont des coques Gram positif, anaérobies facultatifs, catalase-négatifs, se présentant de manière isolée, en paires ou en courtes chaînes. La température optimale de croissance d'*E. Faecalis* est de 35 °C, et fait partie de la flore normale du tractus gastro-intestinal, des voies génitales féminines, et de la cavité orale (ASPC, 2016).

## **2. Activité antifongique des extraits des plantes**

Le pouvoir antifongique des plantes aromatiques a été mis en évidence par de nombreuses études, contre les moisissures et les champignons pathogènes, les études de (Prudent et *al.* 1995) qui a noté que l'huile essentielle de Citrus, montrent une activité antifongique, contre *Aspergillus Niger*, *Penicillium Chrysogenum* et d'autres moisissures.

*Candida Tropicalis* est un agent opportuniste du genre Champignon, qui cause la Candidose, sous forme d'infections superficielles de la peau, des muqueuses et des ongles

(Onyxix) plus rares, qu'avec *Candida Albicans*, et aussi sous forme, d'infection profondes invasives uniquement chez l'immunodéprimé (Candidémie, pneumonie, méningite, infection des os, abcès divers) (INRS .2015).

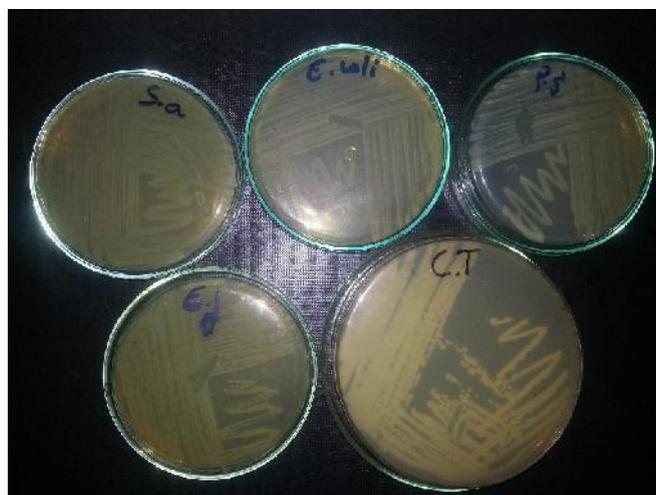
## 1. Matériel végétal

Les échantillons des fruits de *Ziziphus lotus* sont récoltés dans la région de Fès (Centre Nord du Maroc, Zouagha-Moulay Yaâcoub) durant le mois d'août 2016, dont les données climatiques sont résumées dans le tableau 1. Ces derniers ont été nettoyés, rincés et séchés à 30°C, pendant 48h, puis ils sont broyés à l'aide d'un mortier et tamisés pour obtenir une poudre fine servant pour la préparation des extraits.

## 2. Microorganismes testés

Les microorganismes utilisés dans ce travail, sont des souches aérobies constituées de quatre bactéries : *Enterococcus Faecalis*, *Escherichia Coli*, *Staphylococcus Aureus*, *Pseudomonas Aeruginosa* et une levure *Candida Tropicalis*.

*P.Aeruginosa*, *E. Faecalis* et *C.Tropicalis* sont des souches pures issues du Laboratoire d'Ecologie Fonctionnelle et Environnement. *E. coli* et *S. aureus* ont été isolées respectivement, des urines chez des patients qui ont une infection urinaire, au service de néphrologie à l'Hôpital Hassan II de la ville de Fès (Maroc). Ces bactéries ont été identifiées et confirmées par la biochimie classique et l'API (bio Mérieux, France). Les microorganismes-cibles sont pour la plupart des pathogènes pour l'homme. Ils comprennent deux bactéries à Gram positif (*S. aureus* et *E. Faecalis*) et deux à Gram négatif (*E. coli* et *P. aeruginosa*). La préparation de la culture des germes tests est réalisée sur le milieu LB, pour les souches bactériennes et sur le milieu YPG, pour la levure. Les cultures ont été incubées à une température optimale de croissance des souches cibles : 37°C, pour les bactéries et 30°C, pour la levure. Ensuite, elles ont été utilisées pour la réalisation des tests pour mettre en évidence l'activité microbienne.



**Figure 2** : Les cinq souches étudiées utilisées en Boites de Pétri

### 3. Préparation des extraits

Dans le but d'obtenir des essences végétales à partir de la pulpe des fruits de *Z. lotus*, trois types d'extraits ont été préparés : Ethanolique (EE), méthanolique (EM) et aqueux (EA). La méthode d'extraction adoptée est Soxhlet, elle consiste à placer 15g de la poudre végétale à l'extraction par deux solvants (EE, EM) au Soxhlet avec un rapport de 1/10 (P/V), pendant 7 heures. Le solvant utilisé a été éliminé par évaporation, sous pression réduite, dans un rotavapor à 40°C. Après évaporation totale du solvant, l'extrait obtenu est stocké à 4 °C et à l'abri de la lumière.



**Figure 3 :** Extraction par Soxhlet



**Figure 4 :** Evaporation du solvant par Rotavapor

### 4. Calcul du rendement des extraits

Le rendement est déterminé par le rapport du poids de l'extrait sec après évaporation (m) sur le poids de la matière végétale sèche (ms) utilisée pour l'extraction, multiplié par 100 (Bekhechi, 2001).

$$\text{Rdt}(\%) = [m/ms] \times 100$$

### 5. Dosage des métabolites des extraits

Nous avons procédé à un dosage des polyphénols, des flavonoïdes et des tanins dans les extraits végétaux issus des fruits de *Z. lotus*.

### 5.1 Dosage des polyphénols

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué par la méthode d'Atanassova et ses collaborateurs(2011) qui consiste à mélanger 1 ml de l'échantillon, dix fois dilué avec 0.5 ml du réactif de Folin-Ciocalteu et 2.5ml d'une solution de carbonate de sodium  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (20%). L'ensemble est agité au vortex, puis placé à l'obscurité pendant 40 mn, l'absorbance a été déterminée à 725 nm (CHROM TECH V1200). La gamme d'étalonnage réalisée par des concentrations de l'acide gallique, est exprimée en  $\mu\text{g}$  d'équivalent d'acide gallique, par milligramme d'extrait ( $\mu\text{g}$  EAG /mg d'extrait).



**Figure 5 :** Dosage des polyphénols

### 5.2 Dosage de flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes totaux a été réalisé selon la méthode de trichlorure d'aluminium décrite par Barros et ses collaborateurs(2011). En effet, 0.3 ml d'une solution de  $\text{NaNO}_2$  (5%) est mélangé avec une fraction aliquote (1 ml) d'extrait. Après 5 mn, nous avons ajouté 0.3ml d'une solution d' $\text{AlCl}_3$  (10%). Après 6 mn, 2ml de  $\text{NaOH}$  (1M) sont ajoutés et le volume total a été complété à 10 ml avec de l'eau distillée. L'absorbance a été mesurée à 510nm. La concentration des flavonoïdes est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine, et est exprimée en  $\mu\text{g}$  d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait ( $\mu\text{g}$  EQ /ml d'extrait).



**Figure 6 :** Dosage des Flavonoïdes

### 5.3 Dosage des tanins condensés

Pour déterminer le taux des tanins condensés nous avons utilisé la méthode de Ribereau-Gayon et Stonestreet (1966) qui consiste à mélanger 1ml d'extrait dilué 2 fois avec 1,5ml d'HCl et 0,5 d'eau distillée. Le contenu des tubes est ensuite divisé en deux (tube A et tube B). Le tube A est laissé à la température ambiante alors que le tube B est porté au bain marie (100°C) pendant 30 mn. Les absorbances des tubes A et B sont lues à 550 nm (CHROM TECH V1200).

Les résultats sont exprimés par la relation suivante :

$$T \text{ (g/l)} = (\text{DO TB} - \text{DO TA}) \times 19,33$$

## 6. Test de l'activité antimicrobienne

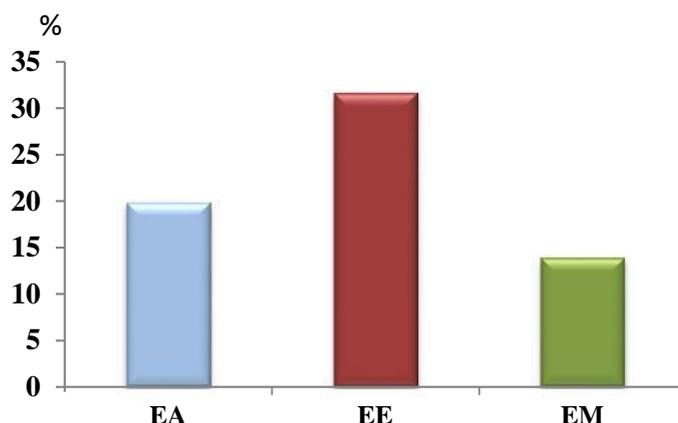
Le principe de la détection de l'activité antimicrobienne est basé sur la diffusion de l'agent antimicrobien, dans des milieux de culture solides ou semi-solides, pour inhiber la croissance d'un micro-organisme indicateur sensible. A partir de colonies jeunes de 18 à 24 h, une suspension microbienne a été réalisée dans l'eau physiologique stérile pour chaque souche. La turbidité de cette suspension est ajustée à 0.5 Mc Farland. Cet inoculum est ensemencé par inondation sur des boîtes de Pétri, contenant le milieu de culture LB-Miller, pour les bactéries et le milieu YPG pour la levure. La méthode utilisée, est celle de diffusion par puits sur gélose, telle que décrite par Berghe et Vlietinck (1991). Celle-ci consiste à réaliser des puits de 5 mm de diamètre à l'aide d'une pipette pasteur. Ils sont ensuite remplis par 60 µl de l'extrait obtenu dissous dans le DMSO (Diméthylsulfoxyde). La lecture des

résultats est réalisée après 24 heures, pour les bactéries et 48 heures pour la levure. L'inhibition de la souche indicatrice se traduit par la formation de zones d'inhibition claires autour des puits. Le diamètre d'inhibition est ainsi, déterminé en mm.

## I. Résultats

### 1. Rendement des extraits

Les résultats obtenus montrent que le rendement des extraits des fruits de *Ziziphus lotus* varie en fonction du solvant utilisé (Figure 7). Ainsi, l'extrait éthanolique présente le rendement le plus élevé (31,35%) par rapport à l'extrait méthanolique (13,79%) et à l'extrait aqueux (19,73%). L'analyse de variance montre que le facteur solvant a un effet hautement significatif sur le rendement (ANOVA :  $F = 46,88$  ;  $ddl = 2$  ;  $P = 0,005$ ) (Annexe 1).



**Figure 7** : Taux du rendement d'EA, EE et EM des fruits du *Ziziphus Lotus*

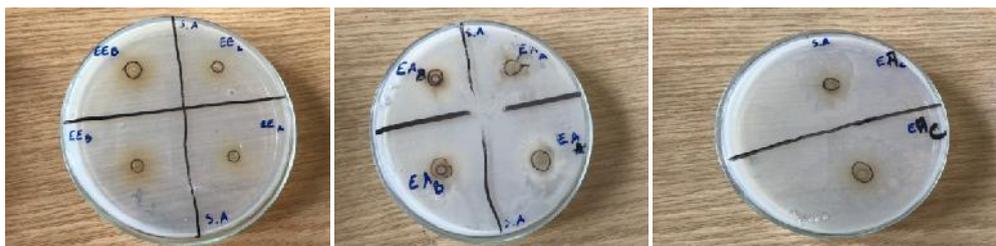
### 2. Activité antimicrobienne

Les résultats de l'activité antimicrobienne des extraits, estimée par le diamètre de la zone d'inhibition, autour des puits, sont présentés dans le tableau 1. A l'exception de la levure *C. Tropicalis*, les souches bactériennes : *E. Coli*, *S. Aureus*, *P. Aeruginosa* et *E. Faecalis* ont manifesté une sensibilité vis-à-vis des trois extraits de la pulpe de *Ziziphus lotus* (Figures 8, 9, 10 et 11). La réaction des microorganismes, vis-à-vis de produit utilisé, s'est avérée variable selon la souche testée et en fonction de la nature de l'extrait utilisé. Le Diméthylsulfoxyde a été utilisé, en tant que contrôle négatif et n'a montré aucun effet néfaste sur la croissance microbienne. *S. Aureus* se révèle la plus sensible pour les trois extraits. Par contre, *E. Coli* se montre plus résistante, par rapport aux autres souches étudiées. Ainsi, les résultats obtenus, montrent que l'EE du *Ziziphus lotus* semble être le plus puissant au niveau de l'activité antibactérienne, par rapport à l'EM et l'EA, pour la plupart des souches étudiées. L'analyse de la variance relative à la zone d'inhibition, montre une différence significative entre les trois extraits étudiés sur la croissance d'*E. Faecalis* et d'*E. Coli* (ANOVA :  $F = 9,5$  ;  $ddl = 2$  ;  $P =$

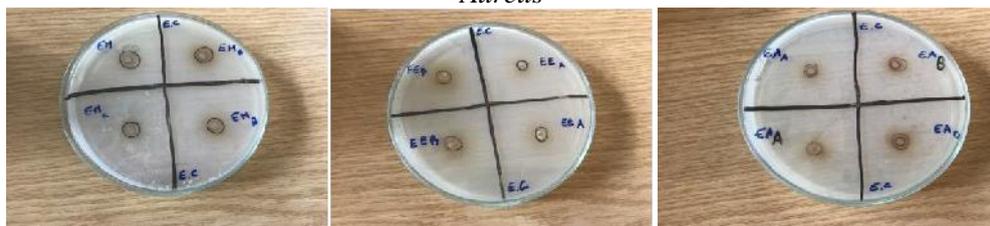
0,05). Par contre aucune différence significative n'a été enregistrée entre *S. Aureus* et *P. Aeruginosa*.

**Tableau 1** : Diamètres des zones d'inhibition en fonction de la nature de l'extrait

Souches	Diamètre des zones inhibition (mm)		
	Aqueux	Ethanolique	Méthanolique
<i>Escherichia coli</i>	10,5	11,5	7
<i>Staphylococcus Aureus</i>	12,5	15	15
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	11	9	10
<i>Enterococcus Faecalis</i>	11,5	15	12
<i>Candida Tropicalis</i>	–	–	–



**Figure 8** : Auréoles d'inhibition chez *Staphylococcus Aureus*



**Figure 9** : Auréoles d'inhibition chez *Escherichia Coli*



**Figure 10** : Auréoles d'inhibition chez *Enterococcus Faecalis*



**Figure 11:** Auréoles d'inhibition chez *Pseudomonas Aeruginosa*

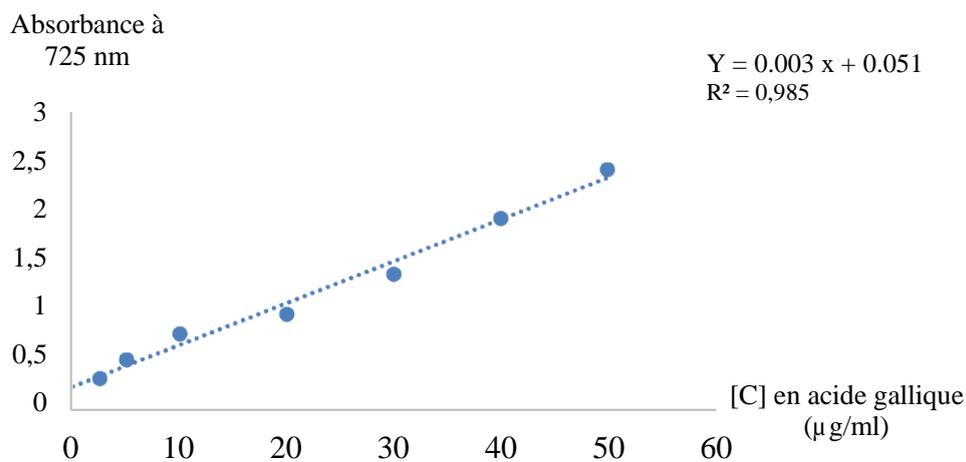


**Figure 12 :** Auréoles d'inhibition chez *Candida Tropicalis*

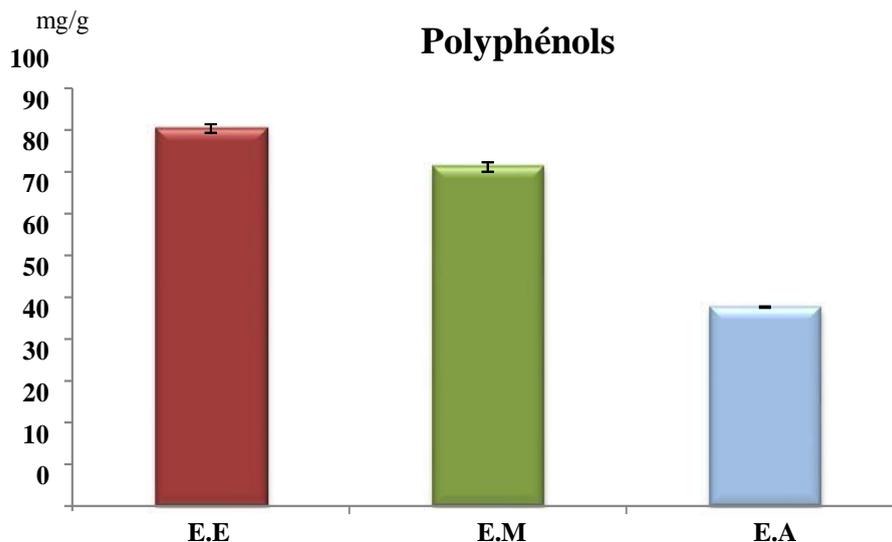
### 3. Dosage des métabolites des extraits

#### 3.1 Dosage des polyphénols

Les résultats de la courbe d'étalonnage et de la teneur en polyphénols sont respectivement, donnés par les figures 13 et 14. Ainsi, la teneur en polyphénols est plus importante avec l'EE ( $90,3 \pm 1 \mu\text{g/g}$ ) par rapport à l'EM ( $81,1 \pm 1,1 \mu\text{g/g}$ ) et à l'EA ( $47,6 \pm 0,1 \mu\text{g/g}$ ). La différence existante entre les trois extraits est hautement significative entre l'EA d'une part et l'EE et l'EM d'autre part (ANOVA : ddl=2 ;  $F= 77,39$  ;  $P < 0,001$ ) (Annexe 6).



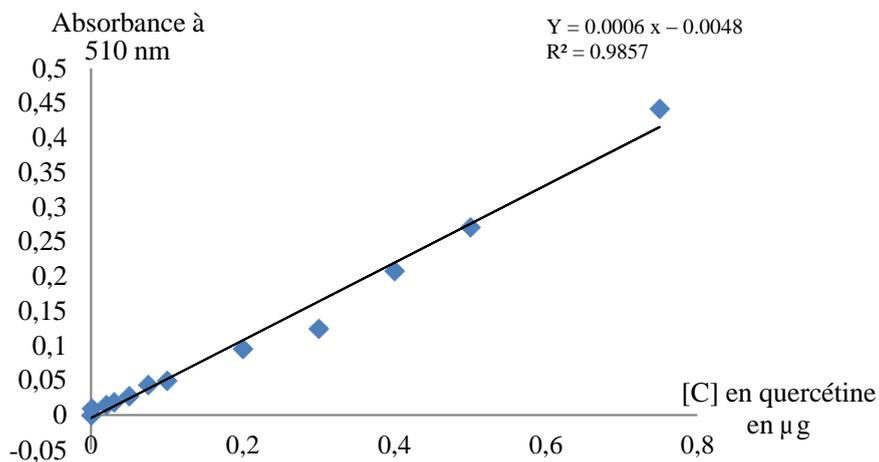
**Figure 13:** Courbe d'étalonnage d'acide gallique



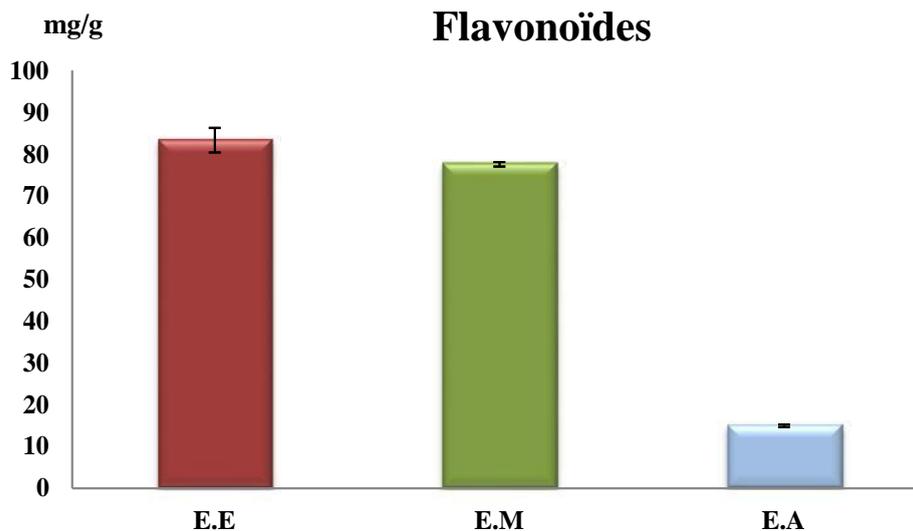
**Figure 14:** Teneur en polyphénols des extraits des fruits de *Z. lotus*

### 3.2 Dosage des flavonoïdes

Les résultats obtenus sur la teneur en flavonoïdes en fonction de la nature de l'extrait utilisé, montrent qu'il y'a une différence hautement significative entre l'EA (15±0.3 mg/g) d'une part et l'EE (83.3±2.9 mg/g) et l'EM (77.6±0.6 mg/g) d'autre part (Figure 16). La teneur la plus importante obtenue est celle de l'EE suivie de l'EM; par contre celle d'EA est la très faible (ANOVA : ddl=2 ; F= 477,685 ; P <0,001) (Annexe 7).



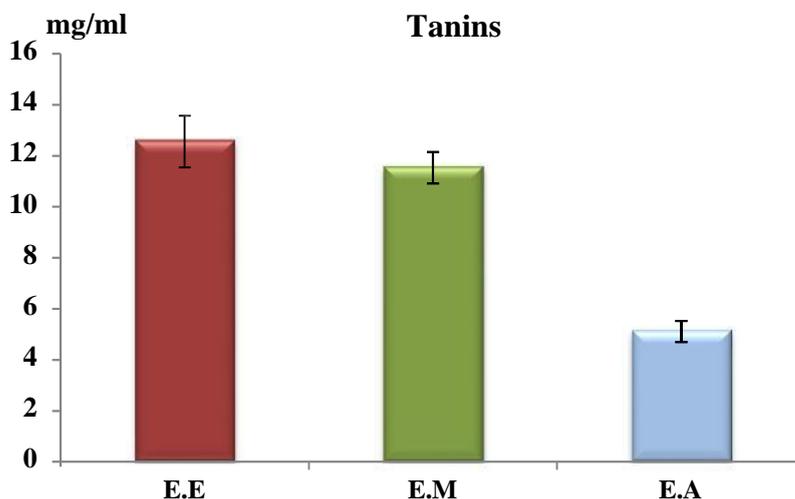
**Figure 15:** Courbe d'étalonnage de la quercétine



**Figure 16** : Teneur en flavonoïdes des extraits des fruits de *Z. lotus*

### 3.3 Dosage des Tanins

La teneur en tanins est de l'ordre  $9,3 \pm 2,3$  et  $10,9 \pm 1,2$  et  $5,1 \pm 0,4$  mg/ml respectivement pour l'EE, l'EM et l'EA (Figure 17). La teneur d'EA semble la plus faible des trois extraits utilisés. La différence existante entre les deux extraits (EE et EM) d'une part et d'EA d'autre part est hautement significative (ANOVA : ddl=2 ; F= 32,187 ; P = 0,04) (Annexe 8).



**Figure 17** : Teneur en tanins des extraits des fruits de *Z. lotus*

## II. Discussion

D'après les résultats obtenus, nous avons pu montrer que le rendement des extraits étudiés ainsi que leur activité antimicrobienne varient en fonction de la nature de solvant utilisé. En effet, L'EE présente le rendement le plus élevé, par rapport à l'EM et l'EA. Ces résultats sont relativement, semblables à ceux obtenus par certains auteurs (Rssaisi et *al.*, 2013 ; Hamza et *al.*, 2015) ayant travaillé sur l'EE du *Ziziphus lotus* semble avoir un effet inhibiteur, le plus puissant, contre la plupart des souches étudiées. Ce qui est en accord avec les résultats d'Ertürk (2006) ayant révélé que l'extrait éthanolique du cumin est plus actif contre *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, par rapport à l'extrait méthanolique du cumin. De même, Les résultats de Mohsen et Ammar (2009), ont prouvé que l'éthanol était le meilleur solvant pour l'extraction des composés phénoliques, suivi du méthanol et enfin de l'eau. Ceci pourrait expliquer l'efficacité de l'EE contre la plupart des souches étudiées.

Cette étude nous a permis aussi d'évaluer l'activité antimicrobienne de ces extraits sur la croissance *in vitro* de souches bactériennes et fongique. L'activité inhibitrice de croissance exercée par l'extrait aqueux, éthanolique et méthanolique sur des souches bactérienne, témoigne de la réalité d'un pouvoir antibactérien inhérent aux pulpes de *Ziziphus lotus*, avec un spectre d'action antibactérien qui touche indistinctement les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif. Les trois extraits ont réagi positivement sur les souches bactériennes ce qui confirme que la pulpe de *Ziziphus lotus* est douée des propriétés antibactériennes. Il apparaît que *Staphylococcus Aureus* (gram positive) est la bactérie, la plus susceptible en comparaison avec les autres souches (gram négative) ; ceci peut être attribué à la différence de structure entre les bactéries (gram positives) et les bactéries (gram négatives). La paroi cellulaire des bactéries gram positives est constituée par une seule couche, alors que la paroi cellulaire des grams négatifs, a une structure multicouche liée, par une membrane cellulaire externe (Ali-Shtayeh *et al.*, 1998). Nos résultats montrent que les extraits ont eu une activité antibactérienne en inhibant la croissance des germes bactériens. L'analyse des résultats obtenus a montré que l'extrait éthanolique a révélé une présence de polyphénols, flavonoïdes et tanins plus importante des extraits méthanoliques. Plusieurs facteurs peuvent influencer sur la teneur en composés phénoliques. Des études ont montré que les facteurs extrinsèques (tels que les facteurs géographiques et climatiques), les facteurs génétiques, le degré de maturation de la plante et la durée de stockage ont une forte influence sur le contenu en polyphénols (Anganga et *al.*, 2001 ; Bouzid et *al.*, 2011).

## CONCLUSION GENERALE

L'étude des propriétés antimicrobiennes des extraits de la pulpe du *Ziziphus lotus* nous a permis d'obtenir des résultats intéressants. En effet, les trois extraits éthanolique, méthanolique et aqueux ont montré une activité inhibitrice vis-à-vis des quatre souches bactériennes. Les résultats ont montré que l'extrait éthanolique présente une activité inhibitrice sur les bactéries testées, plus élevée, que celle de l'extrait méthanolique et l'extrait aqueux et que la bactérie à Gram positif *Staphylococcus aureus* s'est avérée la plus sensible alors les bactéries à Gram négatif *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* se sont avérées les plus résistantes. Ces résultats sont encourageants et montrent que l'utilisation de *Ziziphus lotus*, comme anti infectieux, en milieux traditionnels est justifiée et qu'elle devrait être abordée d'une manière plus profonde afin d'explorer son potentiel dans le traitement des maladies infectieuses. L'analyse des résultats obtenus ont montré que l'extrait éthanolique a révélé une présence de polyphénols, flavonoïdes et tanins plus importante que des extraits méthanoliques. Il serait donc, intéressant d'étendre l'éventail des tests antimicrobiens, ainsi que l'isolement et la caractérisation des composés actifs, dans les différents extraits, en vue d'identifier les éléments responsables des activités biologiques de cette plante et de ses dérivés et par ailleurs, chercher également l'activité antifongique de la même plante, récoltée dans différentes régions, afin d'analyser l'incidence de l'environnement sur la composition chimique de *Z. lotus* et par conséquent, sur le taux de substances naturelles ayant un pouvoir antimicrobien.

- Abdel-Zaher A.O., Salim S.Y., Assaf M.H. et Abdel-Hady R.H. (2005).** Antidiabetic activity and toxicity of *Zizyphus spina-christi* leaves. *J. Ethnopharmacol*, 101:129-138.
- Abderrazak M. et Joël R. (2007).** La botanique de A à Z. Ed. Dunod. Paris. 177p
- Abu-Zarga M., Sabri S., Al-Boudi A., Ajaz S., Sultana N. et Rahman A.U. (1995).** New cyclopeptide alkaloids from *Zizyphus lotus*. *Journal of Natural Products*, 58:504-511.
- Aganga AA. et Mosase KW (2001).** Tannins content, nutritive value and dry matter digestibility of *Lonchocarpus capussa*, *Zizyphus mucropata*, *Sclerocarya birrea*, *Kirkia acuminata* and *Rhus lancea* seeds. *Anim Feed Sci Technol* 91:107–13
- Agence de la santé publique du Canada,** <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/enterococcus-fra.php>
- Ali-Shtayeh M.S., Yaghmour R.M.R., Faidi Y.R., Salem K. et Al Nuri M.A.(1998).** Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area. *Journal of Ethno Pharmacology*, 60 : 265-271.
- Atanassova M., Georgieva S., et Ivancheva K. (2011).** Total Phenolic And Total Flavonoid Contents, Antioxidant Capacity And Biological Contaminants In Medicinal Herbs, *J. Chem. Technol. Metall.* 46 - 81–88.
- Barros L., Carvalho A.M., et Ferreira C.F.R.I.(2011).** Exotic fruits as a source of important phytochemicals : Improving the traditional use of *Rosa canina* fruits in Portugal. *Food Research International*, Vol 44(7) : 2233-2236.
- Bekhechi-benhabib C. (2001).** Analyse d'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata* (Nûnkha) de la région de Tlemcen et étude de son pouvoir antimicrobien. Thèse de magister de Biologie, Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen, Algérie.
- Benammar C.H. (2011).** Effet antioxydants et immunomodulateurs d'une plante médicinale Nord Africaine, *Zizyphus lotus L.* (Sedra) : Etude des différents extraits. Thèses de doctorat. Université d'Abou Bekr Belkaid-Tlemcen.1-14p.
- Berghe V.A. et Vlietinck A.J. (1991).** Screening Methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. *Method for Plant Biochemistry*, 6 : 47-68.
- Boizot N. et Charpentier .J.P. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre foustier. *Le cahier des techniques de l'Inra.* pp 79-82. (cited in DjemaiZoueglache S, 2008)

**Borgi W., Recio M.C., Rios J.L. et Chouchane N. (2008).** Anti-inflammatory and analgesic activities of flavonoid and saponin fractions from *Zizyphus lotus* (L.) Lam. South African journal of botany, 74: 320-324

**Bouزيد W., Yahia M. et Abdeddaim M. (2011).** Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de l'aubépine monogyne. Leban Sci J 12:1

**Bruneton, J. (1999).** Pharmacognosie, Phytochimie – Plantes médicinales – 3ème Ed Techniques et documentations. Paris. pp: 227-310-312-313-314.494.

**Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A.A., et Capasso F. (1999).** Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. Life. Sci. 65 (4): 337-53.

**Ertürk Ö. (2006).** Antibacterial and antifungal activity of ethanolic extracts from eleven spice plants. Biologia Bratislava, 61: 275-278.

**Garcia-Ruiz A., Bartolomé B., Martinez-Rodriguez A.J., Pueyo E., Martin-Alvarez P.J., et Moreno-Arribas M.V. (2008).** Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine. Food Control. 19: 835–841

**Ghestem A., Seguin E., Paris M., et Orecchioni A.M. (2001).** Le préparateur en pharmacie dossier 2èmeEd TEC&DOC. Paris. pp275. (cited in Djemai Zoueglache S, 2008)

**Hamza K. et Meziani A. (2015).** Etude de l'activité biologique de l'extrait Aqueux des feuilles du *Zizyphus lotus* L. (Université des Frères Mentouri Constantine Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie) p.37-38.

**Harborne J.B. et Williams C.A. (2000).** Advances in flavonoid research since 1992 Phytochemistry. 55: 481-504.

**INRS,**

[http://www.inrs.fr/baobab/BAOBAB.nsf/\(allDocParRef\)/Candida\\_tropicalis?opendocument&format=print](http://www.inrs.fr/baobab/BAOBAB.nsf/(allDocParRef)/Candida_tropicalis?opendocument&format=print), 2015

**Kempf S. Zeitouni. (2009).** Coût biologique de la résistance aux antibiotiques: analyse et conséquences Pathologie Biologie : article in press.

**Khanbabae K. et Ree T.R. (2001).** Tannins:Classification and Defenition. Journal of Royal Society of Chemistry. 18: 641-649.(cited in Djemai Zoueglache S, 2008)

**King A., et Young G. (1999).** characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals.Jof the American dietetic association.99:213-218. (cited in DjemaiZoueglache S, 2008)

- Lugasi A., Hovari J., Sagi K. et Biro L. (2003).** The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *J.Acta.biologica. szegediensis.* 47 (1-4):119-125. (Cited in Mohammedi Z, 2005)
- Lutge U., Kluge M. et Bauer G. (2002).** Botanique 3ème Ed : Technique et documentation. Lavoisier .Paris. 211p.
- Mohsen S.M. et Ammar A.S.M. (2009).** Total phenolic contents and antioxidant activity of corn tassel extracts. *Food Chem,* 112: 595-598.
- Nauciel. C. et Vildé J.L. (2005).** Bactériologie médicale, 2ème Ed. Masson. Paris. pp: 5-10
- Paris M. et Hurabielle. (1981).** Abrégé de matière médicale. Pharmacognosie. Tome 1. Ed Masson. Paris. pp: 102-103-104-107
- Patrick B., Jean L., et Michel S. (1988).** Bactériologie : Les bactéries des infections humaines. 1er Ed Médecine –Sciences Flammarion. Paris. pp: 100-108-274
- Ribéreau-Gayon P. et Stonestreet E. (1966).** Le dosage des tanins dans le vin rouge et détermination de leur structure. *Chim. Anal.* 1966, 48, 188–192
- Richard C., et Kiredjian M. (1995).** Méthodes de laboratoire pour l'identification des bacilles à gram négatif aérobies stricts: *Pseudomonas, Alcaligenes, Flavobacterium, Acinetobacter, Brucella, Bordetella.* 2ème édition. Ed Institut. Pasteur .Paris. pp: 42-43
- Rollinger J.M., Haupt S., Stuppner H. et Langer T.J. (2004).** Combining ethnopharmacology and virtual screening for lead structure discovery : COX-inhibitors as application example. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences,* 44 : 480-488.
- Rsaissi N. et Bouhache M. (2002).** La lutte chimique contre le jujubier .Programme National de transfert de Technologie en Agriculture (PNTTA), DERD (Ed) Rabat.(94) : 4p
- Rsaissi N., EL Kamili-Bencharki B., Hillali L. et Bouhache M. (2013).** Antimicrobial activity of fruits extracts of the wild jujube "*Ziziphus Lotus (L.) Desf.* *International Journal of Scientific & Engineering Research,* Volume 4, Issue 9.
- Seyoum A., Asres K. et El-Fiky F.K. (2006).** Structure–radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry.* 67: 2058–2070

- Steven P., Rachel C., Martha E., Paul. H., Jane S. et Peter W.J. (2004).** Microbiology of Waterborne Diseases. Ed Elsevier Academic Press. pp71-132
- Suksamrarn S., Suwannapoch N., Aunchai N., Kuno M., Ratananukul P., Haritakum R., Jansakul C. et Ruchirawat S. (2005).** Ziziphine N, O, P, new antiplasmodial cyclopeptides alkaloids from *Zizyphus oenoplia* var. *brunoniana*. *Tetrahedron*, 61 :1175-1180
- Tapiero H., Tew K.D., Nguyen B.G. et Mathé G. (2002).** Polyphenol do they play a role in the prevention, of the human pathologies? *Biomed.pharmacother.* 56: 200-207. (cited in DjemaiZoueglache S, 2008).
- Yano Y., Satomi M. et Oikawa H. (2006).** Antimicrobial effect of spices and herbs on *Vibrio parahaemolyticus*. *International Journal Food Microbiology*, 111 : 6-11.

**Annexe 1** : Tableau de l'analyse de la variance relative au rendement des différents extraits de *Ziziphus lotus*

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	P
<b>Extraits</b>	508,098	2	254,049	46,888	<b>0,005</b>
<b>Erreur</b>	16,255	3	5,418		

**Annexe 2** : Tableau de l'analyse de la variance relative au diamètre d'inhibition de différentes concentrations des extraits organiques des fruits de *Z. lotus* sur *S. Aureus*

Source des variations	SC	ddl	MC	F	P
<b>Extraits</b>	8,333	2	4,167	5	<b>0,111</b>
<b>Erreur</b>	2,5	3	0,833		

**Annexe 3** : Tableau de l'analyse de la variance relative au diamètre d'inhibition de différentes concentrations des extraits organiques de *Z. lotus* sur *E. Faecalis*

Source des variations	SC	ddl	MC	F	P
<b>Extraits</b>	19	2	9,5	9,5	<b>0,05</b>
<b>Erreur</b>	3	3	1		

**Annexe 4** : Tableau de l'analyse de la variance relative au diamètre d'inhibition de différentes concentrations des extraits organiques de *Z. lotus* sur *E. Coli*

Source des variations	SC	ddl	MC	F	P
<b>Extraits</b>	22,333	2	11,167	33,5	<b>0,009</b>
<b>Erreur</b>	1	3	0,333		

**Annexe 5** : Tableau de l'analyse de la variance relative au diamètre d'inhibition de différentes concentrations des extraits organiques de *Z. lotus* sur *P. Aeruginosa*

Source des variations	SC	ddl	MC	F	P
<b>Extraits</b>	4	2	2	0,6	<b>0,604</b>
<b>Erreur</b>	10	3	3,333		

**Annexe 6** : Tableau de l'analyse de la variance relative à la teneur en polyphénols en fonction des extraits organiques des fruits du *Z.lotus*

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	P
<b>Extraits</b>	3222000000	2	1611000000	77,392	<b>0,000</b>
<b>Erreur</b>	1249000000	6	20 817 283,966		

**Annexe 7** : Tableau de l'analyse de la variance relative à la teneur en flavonoïdes en fonction des extraits organiques des fruits du *Z.lotus*

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	P
<b>Extraits</b>	8616000000	2	4308000000	477,685	<b>0,000</b>
<b>Erreur</b>	54 111 111,139	6	9 018 518,523		

**Annexe 8** : Tableau de l'analyse de la variance relative à la teneur en tanins en fonction des extraits organiques des fruits du *Z.lotus*

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	P
<b>Extraits</b>	<b>64,373</b>	<b>2</b>	<b>32,187</b>	<b>5,245</b>	<b>0 ,048</b>
<b>Erreur</b>	<b>36,816</b>	<b>6</b>	<b>6,136</b>		