

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Ibn Khaldoun –Tiaret-



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Domaine : "Sciences de la Nature et de la Vie"

Filière : "Sciences biologiques"

Spécialité : "Biotechnologie microbienne."

Présenté et soutenu publiquement par

- KHATTOUF Naouel.

-KHELIFI Wafa Sarah

Thème

**Etude de l'activité antimicrobienne des jeunes
cladodes de figuier de barbarie« *d'Opuntia -Ficus -
Indica* »**

JURY:

- Président : M. GUEMOU Laid. MAA
- Promoteur : M. MOUSSAOUI Badr-eddine. MAA

Année universitaire : 2017-2018

Remerciements

Nous remercions ALLAH tout puissant, maître des cieux et de la terre, qui nous a permis de mener à bien ce travail.

*On tient à adresser nos plus vifs remerciements à notre promoteur **M.Moussaoui Badr Eddine**, qui nous a fait l'honneur de réaliser ce travail sous sa direction, pour sa grande patience, pour sa disponibilité et ses conseils judicieux.*

*Nous tenons à adresser nos vifs remerciements à **M. GUEMOU Laid**, pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant d'examiner ce travail.*

Nous témoignons toute notre gratitude pour Dr SASSI Mohamed, responsable du master "Biotechnologie microbienne" pour les conseils qui nous a donné.

*On remercie également **M. Mustapha**, le responsable du laboratoire Hygiène et pathologie animale, de nous avoir accueilli dans son laboratoire, et les ingénieures de ce laboratoire pour l'aide qu'ils nous ont apporté durant notre travail.*

On remercie toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Un grand merci à tous

DEDICACE

*Je dédie ce travail à mes **Parents** qu'ils trouvent ici toute ma gratitude pour leur soutien tout au long de mes études*

*A mes sœurs **Samira et Dalel** et mes frères **Abed, Adda et Hakim***

*À mon mari **Djalile** et mon fils **Sohaib***

*A mes amis **Khouloud et Asma***

A toute la promotion de biotechnologie microbienne

A ceux qui m'ont tout donné sans rien en retour.

Khelifi Wafa Sarah

DEDICACE

*Je dédie ce travail à mes **Parents** qu'ils trouvent ici toute ma gratitude pour leur soutien tout au long de mes études*

*A mes sœurs **Touta et shaima** et mes frères **Lahcene , Houcine et Mohamed** .*

A mon mari.

*A mes amis **Khouloudet Asma**.*

A ceux qui m'ont tout donné sans rien en retour

Khattouf Nawel

Table des matières

Table des matières.

- I. Liste des abréviations
- II. Liste des figures
- III. Liste des tableaux

Introduction	01
--------------------	----

Chapitre I: Matériel et méthodes

Objectifs	03
I.1. Lieu et durée d'étude	03
I.2. Matériel	03
I.2.1. Matériel végétal	03
I.2.2. les souches microbiennes	03
I.2.2.a) Les bactéries	03
I.2.2.b) Les champignons	04
I.2.3. Matériel du laboratoire	04
II. Méthodes	05
II.1. Protocole expérimental	05
II.2. Préparation des extraits	05
II.2.1. Caractérisation des cladodes	05
II.2.1.1) Teneur en eau	05
II.2.1.2) Matière sèche	05
II.2.2. extraction des polyphénols.....	07
II.2.2.1) Préparation de la poudre	07
II.2.2.2) Extraction alcoolique	07
II.2.3. Caractérisation phytochimique de l'extrait	07
II.2.3.1. Dosage des composés phénoliques	07
II.2.3.2. Dosage des flavonoïdes	08
II.3. Tests de vérification des souches	09
II.3.1. l'examen macroscopique	09
II.3.2. L'examen microscopique	09
A) Etat frais	09
B) Coloration de Gram	09
II.3.3. Tests biochimiques.....	09
A) Test de catalase	09
B) Test de l'oxydase	10
C) Test Mannitol-Mobilité	10
D) Test de TSI (Triple SugarIron agar)	10
II.4. Activité antimicrobienne	11
II.4.1. Méthode de diffusion (Antibiogramme).....	11
II.4.1.1. Activité antibactérienne	11
1. Préparation du milieu de culture.....	11
2. Stérilisation du matériel.....	12
3. Préparation des dilutions d'extrait	12

4. Préparation de l'inoculum.....	12
5. Ensemencement et dépôt des disques	12
6. Lecture des antibiogrammes	13
II.4.1.2. Activité antifongique	13
II.4.2. Méthode de diffusion en milieu gélosé par les puits	14

Chapitre II: Résultats et discussion

III .Préparation de l'extrait des jeunes cladodes d'opuntia ficus indica.....	15
III.1. Caractérisation des cladodes	15
III.2. Extraction des polyphénols	15
III.3. Caractérisation phytochimique	15
III.3.1. Dosage des polyphénols totaux	16
III.3.2. Dosage quantitative des Flavonoïdes	16
IV. La vérification des souches	16
IV.1. Aspect macroscopique	17
IV.2. Aspect microscopique	17
IV.2.1. Etat frais et coloration de Gram	17
IV.3. Les tests biochimiques.....	19
V. L'activité antimicrobienne de l'extrait	21
V.1. La méthode des disques	21
V.2. La méthode des puits	23

Conclusion générale

Références bibliographique

Annexes

Résumé

Liste des abréviations

ATCC : American type culture collection = Collection américaine des cultures type.

BP : Baird Parker.

CMB : Concentration minimale bactéricide.

CMI : Concentration minimale inhibitrice.

DO : Densité Optique.

EMB : Eosine Bleu de Méthylène

mgEAG/g MS : milligramme d'Acide Gallique/gramme de Matière Sèche.

mg EQ/g MS : milligramme d'Equivalent Quercitain/gramme de Matière Sèche.

MH : Mueller Hinton.

MS : Matière Sèche.

OMS : Organisation Mondiale de la Santé.

Ox: oxydase.

TSI : Triple Sugar Iron.

Liste des figures

Figure N° 01: Carte géographique du lieu de provenance des cladodes.....	03
Figure N° 02: Schéma du protocole expérimental	06
Figure N°03 : La courbe d'étalonnage de l'acide gallique	18
Figure N 04: La courbe d'étalonnage de la quercétine.....	18
Figure N° 05: Exemples d'aspects macroscopiques des souches testés	19
Figure N° 06: Exemples de l'état frais sous microscope optique (G x 40).....	20
Figure N° 07: Photos d'une souche (a) Gram positif et (b) Gram négatif vues par microscopie photonique (G x100)	20
Figure N° 08: exemples des résultats positifs des tests biochimiques	20
Figure N° 12: Résultats de l'antibiogramme par les disques	22
Figure N° 13: Résultats de l'antibiogramme par les puits	24

Liste des tableaux

Tableau N°01: Matériel et réactifs chimiques utilisés	04
Tableau N°02 : Les taux d'humidité et de la matière sèche des cladodes.....	15
Tableau N°03 : Taux des polyphénols et des flavonoïdes de l'extrait des cladodes	16
Tableau N°04: Caractéristiques macroscopiques des souches.....	17
Tableau N°05: Résultats des caractéristiques microscopiques des souches étudiées	17
Tableau N°06: Résultats des tests biochimiques.....	19
Tableau N°07 : Résultats de l'antibiogramme par la méthode des disques	21
Tableau N°08 : Résultats de l'antibiogramme par la méthode des puits	23

Introduction

La découverte des antibiotiques est considérée comme la plus importante avancée thérapeutique de l'histoire de la médecine, et jusqu'à une période récente les antibiotiques étaient désignés comme « remède miracle ». Cependant, aujourd'hui, l'usage abusif d'antibiotiques a conduit à ce que **Stuart Levy** nomme « le paradoxe des antibiotiques »: ces substances travaillent à leur propre échec du fait qu'elles sélectionnent inévitablement les rares souches bactériennes qui leurs résistent (**Levy, 1992**).

La résistance aux antibiotiques est l'une des plus grandes menaces de santé publique dans le monde, et le risque de se retrouver démunis face à des bactéries ultrarésistantes est aujourd'hui une réalité. En plus, et comme tout médicament, les antibiotiques ne sont pas totalement inoffensifs pour l'organisme et peuvent provoquer, en plus de leur action antibactérienne, un certain nombre d'effets indésirables (**Berche et al., 1989**).

Le renouvellement de l'arsenal des molécules anti-infectieuses est devenu, dès lors, une des priorités pour faire face à ce problème de santé publique émergent.

Pour cela, le regain d'intérêt aux plantes médicinales et leurs extraits, est devenu une brûlante préoccupation pour le monde médical, et présente une voie très prometteuse dans l'innovation de la nouvelle génération des remèdes antimicrobiens. Cela tient principalement au fait que le règne végétal représente une source inépuisable d'une immense variété de molécules bioactives; à savoir les coumarines, les alcaloïdes, les acides phénoliques, les tannins, les terpènes et les flavonoïdes, qui ont des intérêts multiples mis à profit en pharmacie (**Bahorun et al., 1996**).

Cependant, l'évaluation des propriétés phytopharmaceutiques antimicrobiennes des plantes d'utilisation rare ou moins fréquente ou non connue dans la médecine traditionnelle, demeure une tâche très intéressante et plus utile à la quête de nouveaux antimicrobiens, puisqu'elles représentent une nouvelle source de ces composés actifs (**Teixeira da Silva, 2004**).

C'est le cas du figuier de Barbarie "*L'opuntia ficus indica*" de l'ouest algérien, et ses raquettes caractéristiques qui ont retenu notre attention, vu leur sous-estimation locale malgré leurs richesses constitutionnelles et leurs potentialités thérapeutiques recélées; approuvées par d'innombrables recherches scientifiques effectuées sur la même espèce dans d'autres pays.

L'actuel travail axé sur ce contexte, est réparti en 3 parties principales:

- La première partie; matériel et méthodes, est consacré à décrire l'ensemble des techniques et méthodes utilisées pour l'extraction et la caractérisation des polyphénols des jeunes raquettes d'opuntia, issues de la région d'Oued lili – Tiaret, ainsi qu'à l'évaluation de leur activité antimicrobienne.
- La deuxième cite les résultats obtenus de notre étude et énonce leur explication et interprétation.
- Une conclusion générale est rapportée à la fin du présent travail en tirant les principaux résultats obtenus, et signale d'ailleurs, les perspectives possibles émanant de cette étude à court et à moyen terme.

Chapitre I :

Matériel et méthodes

Objectifs :

Cette étude a pour but de:

- 1- Extraire et quantifier les polyphénols des jeunes cladodes *d'opuntia ficus indica* de la région de Tiaret.
- 2- Explorer l'activité antimicrobienne de ces métabolites secondaires contre des souches impliquées dans les infections humaines courantes.

I.1. Lieu et durée d'étude :

La partie pratique de ce travail, est effectuée au sein des deux laboratoires "biochimie" et "hygiène et pathologie animale" de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'université « Ibn Khaldoun » de Tiaret. La période de réalisation s'étale du 04-02-2018 au 30-04-2018.

I.2. Matériel :**I.2.1. Matériel végétal :**

Les jeunes cladodes de la variété inerme *d'Opuntia- ficus- Indica*, âgés de moins de 03 mois, et connus par leurs dimensions (12 -20 cm de longueur et 6 - 9 cm de largeur), sont prélevés des arbustes de la commune d'Oued Lili située au nord –est de la wilaya de Tiaret durant le mois de novembre 2017.



Figure 01: Carte géographique du lieu de provenance des cladodes (Google earth, 2018)

I.2.2. les souches microbiennes :

Les micro-organismes testés dans ce travail sont répartis comme suit:

I.2.2.a) Les bactéries :

Les souches bactériennes utilisées, appartenant aux souches de référence de l'American type culture collection (ATCC), proviennent de la collection du laboratoire des microorganismes bénéfiques, des aliments fonctionnels et de la santé "LMBAFS" de l'université de Mostaganem.

On compte cinq bactéries pathogènes et bactérie bénéfique:

Les bactéries pathogènes: *Escherichia Coli* ATCC 25922. *Bacillus Cereus* ATCC 10876. *Bacillus Subtilis* ATCC 6633. *Pseudomonas aerogenosa* ATCC27853. *Staphylococcus Aureus* ATCC 33862.

Les bactéries bénéfiques : *Lactobacillus acidophilus* isolée et identifiée au "LMBAFS" - Mostaganem.

I.2.2.b) Les champignons :

La moisissure *Aspergillus niger* ATCC 106404 et la levure *Candida albicans* ATCC 10231, sont fournies par le même laboratoire originaire des bactéries, le "LMBAFS" - Mostaganem.

I.2.3. Matériel du laboratoire :

L'ensemble du matériel et de produits chimiques exploités durant cette étude, est récapitulé dans le tableau suivant:

Tableau N°01: Matériel et réactifs chimiques utilisés.

Matériel		Produits	
Appareils	Verreries	Produits chimiques	Milieus de culture
- Autoclave	-Ballons	-Eau distillée	-Mannitol-Mobilité
- Centrifugeuse (Hettich)	-Béchers	-Eau physiologique	-Muller Hinton
- Etuve (MEMMERT)	-Eprouvettes	-Eau oxygénée	-EMB
- Agitateur magnétique thermique (IKARCTbasic)	-Erlenmeyers	-Méthanol (CH ₃ OH)	-TSI
- Evaporateur rotatif (Heidolph 2)	-Boîtes de Pétri	-Carbonate de sodium (Na ₂ CO ₃)	
- Spectrophotomètre (VIS BECKMAN Modèle 34)	-Barreaux magnétiques	-	
-Balance analytique(SARTORUS)	-Micropipettes	Chlorure d'aluminium (AlCl ₃)	
-Bec Bunsen		-Violet de Gentiane	
-Broyeur		-Lugol	
-Microscope optique		-Alcool	
		-Fuchsine	
		-Folin-Ciocalteu	

II. Méthodes :

II.1. Protocole expérimental :

Notre expérimentation est subdivisée en trois étapes essentielles:

- Une extraction suivie d'un dosage des polyphénols et flavonoïdes des nopales (jeunes cladodes),
- Une vérification micro/macroscopique des microorganismes testés,
- Une mise en évidence, suivi d'une évaluation le cas échéant, du pouvoir antimicrobien des polyphénols extraits.

Le diagramme de la Figure N° 02 décrit la démarche expérimentale suivie.

II.2. Préparation des extraits :

II.2.1. Caractérisation des cladodes:

II.2.1.1) Teneur en eau:

La teneur en eau est définie comme étant la perte de poids subit lors de la dessiccation (Audigié et al., 1978). Elle a été déterminée par dessiccation de (2g) d'échantillon dans une étuve ventilée à une température de 105°C jusqu'à obtention d'un poids constant. (AFNOR NF V03-40)

La détermination de son taux se fait par le calcul de la différence de poids avant et après la dessiccation selon la formule suivante (Audigié et al., 1978) :

$$H\% = \frac{M1 - M2}{PE} \cdot 100$$

Dont :

H% : Humidité.

M1 : Poids de la capsule + échantillon avant dessiccation.

M2 : Poids de la capsule + échantillon après dessiccation.

PE : La Prise d'Essai.

II.2.1.2) Matière sèche

La matière sèche (MS) est ce que l'on obtient lorsqu'on retire l'eau d'un produit. Elle est exprimée par:

$$MS\% = 100\% - H\%$$

Avec :

MS : Matière sèche.

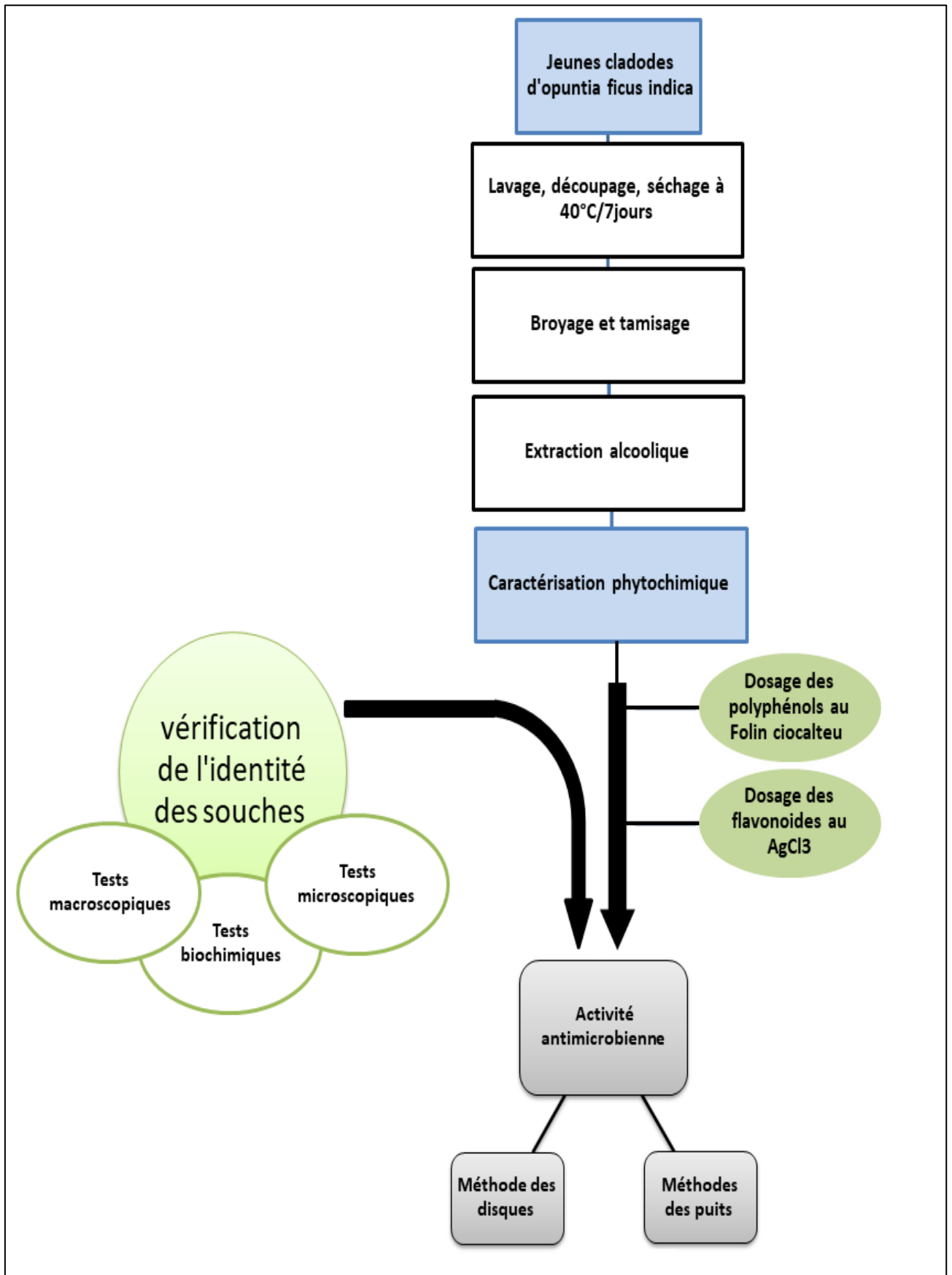


Figure N° 02: Schéma du protocole expérimental.

II.2.2. extraction des polyphénols:

II.2.2.1) Préparation de la poudre:

Une fois la récolte du matériel végétal est réalisée, les raquettes sont lavées à l'eau distillée et débarrassées de leurs épines, avant d'être désinfectées par l'hypochlorite de sodium 10%.

L'échantillon découpé en tranches fines est ensuite séché dans une étuve à 40°C /7 jours, puis rendu en poudre par un broyage de 1000 tr/min, et un tamisage successif à travers un tamis 0,85 mm .La poudre de raquettes ainsi obtenue est conservée dans un bocal hermétique à l'abri de la lumière.

II.2.2.2) Extraction alcoolique:

L'extrait polyphénolique des cladodes a été préparé selon la méthode de **Rsaissi et al (2013)** modifiée, où 5g de la poudre sont macérés dans 200 ml de méthanol, sous agitation mécanique pendant 24 heures à température ambiante.

Le macérât obtenu subit alors une filtration sur papier filtre, pour donner un homogénat qui sera centrifugé à 8000 tr/min pendant 80 min. Le surnageant récupéré est évaporé à 40°C à pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif jusqu'à séchage complet.

Finalement, le résidu sec résultant est reconstitué dans de l'eau distillée, pour être conservé au froid et protégé de l'air et de la lumière.

Le rendement d'extraction est calculé comme suit(**Bruneton, 1999**):

$$R\% = \frac{P2 - P1}{M}$$

Dont :

P1: Poids du ballon vide.

P2 : Poids de l'échantillon après l'évaporation.

M : La masse d'échantillon

II.2.3. Caractérisation phytochimique de l'extrait:

II.2.3.1. Dosage des composés phénoliques

Le dosage des polyphénols totaux de l'extrait des cladodes est réalisé par la méthode de Folin-Ciocalteu (**Rsaissi et al., 2013**).

A) Principe

Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et phosphomolibdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$), il est réduit par les phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}), (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1972). La coloration produite, dont l'absorption maximum est comprise entre 725 et 765 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (Kanoun *et al.*, 2014).

B) Mode opératoire

Brièvement, 1ml de l'extrait et 1ml du réactif de Folin-Ciocalteu 10 fois dilué ont été mélangés et incubés pendant 4 minutes.

Après incubation, 8ml de la solution de carbonate de sodium Na_2CO_3 (75g /l) est ajoutée, et le mélange final est secoué, puis incubé pendant 2h dans l'obscurité à température ambiante. L'absorbance a été mesurée par un spectrophotomètre à 765 nm.

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage, établie avec le standard étalon l'acide gallique (0- 100 μ g/ml) et exprimée en microgrammes d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait (μ g EAG/mg).

II.2.3.2. Dosage des flavonoïdes:

A) Principe

L'estimation de la teneur en flavonoïdes totaux contenus dans notre extrait est réalisée par la méthode de Bahorun *et al.* (1996), connu aussi sous le nom de la méthode du trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$).

Cette technique est basée sur la formation d'un complexe jaunâtre d'aluminium-flavonoïde, ayant une absorption maximale à 430 nm. (Boutakiout, 2017)

B) Mode opératoire:

1ml d'extrait (avec dilution convenable) est ajouté à 1ml d'une solution d' $AlCl_3$ (2% dans le méthanol). Après 10 mn de réaction, l'absorbance est mesurée à 430nm.

La concentration des flavonoïdes est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la Quercétine (0- 100 μ g/ml), et exprimée en milligramme équivalent de rutine par gramme d'extrait (mg ER/g extrait)

II.3. Tests de vérification des souches :

Les souches bactériennes utilisées dans cette étude, ont subi une batterie de tests macroscopiques, microscopiques et biochimiques, ayant pour fin la vérification de leur identité.

II.3.1. l'examen macroscopique :

L'observation de la forme, de la taille et de la couleur des colonies des différentes cultures bactériennes (*E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 33862, *Pseudo aerogenosa* ATCC 27853, *Bacillus sibtillus* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 10876 et *Lactobacillus acidophilus*) est faite à l'œil nu, après ensemencement et incubation sur milieu EMB à 37°C pendant 24h.

Par ailleurs, *Candida albicans* ATCC 10237 et *Aspergillus niger* ATCC 106404 sont observées sur le milieu sabouraud, après une incubation de 7j à 28°C

II.3.2. L'examen microscopique :

A) Etat frais :

Ce test met en évidence la morphologie des bactéries vivantes, leur mode d'arrangement et leur mobilité qui est un caractère important pour l'identification.

Il se pratique sur la culture jeune de 18 à 24 h en milieu liquide ordinaire, à partir de laquelle, une goutte est observée sous un microscope optique à l'objectif (x 40).

B) Coloration de Gram :

Elle permet l'identification des propriétés de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour distinguer et classer les bactéries en **Bactéries Gram (+)** et **Gram(-)**. (Flandrois, 1997)

Les **Gram (+)** gardent la coloration violette après décoloration par l'alcool, tandis que les **Gram (-)** se décolorent par l'alcool, et sont teintées en rose ou en rouge par la Fuchsine.

II.3.3. Tests biochimiques

A) Test de catalase

La catalase est une enzyme qui dégrade le peroxyde d'hydrogène issue de la voie respiratoire oxydative directe en eau et en oxygène libre, qui se dégrade sous forme gazeuse (Marchal et al., 1982).

La technique consiste à dissocier une colonie isolée de la souche à tester à l'aide d'une anse de platine sur une lame de verre contenant une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes. La présence d'une catalase (ou catalase +) se traduit, en quelques secondes, par la formation de bulles d'oxygène (Gerhardt et al., 1994).

B) Test de l'oxydase :

Le test d'oxydase est basé sur la production de l'enzyme indophénol-oxydase par les organismes possédant le *cytochrome C*. Cette enzyme, en présence de l'oxygène atmosphérique, oxyde un colorant redox (dihydrochlorure de Tetra méthyle para phénylène diamine) pour former un composé violet (**Kohler et al., 2009**).

Pratiquement, le disque commercialisé (OX) a été déposé sur une lame propre et imbibé avec une goutte d'eau distillée stérile. Une colonie a été prélevée à partir du milieu à l'aide d'une anse de platine puis déposée sur le disque (**Delarras, 2007**).

Un virage immédiat ou en quelques secondes de la couleur en violet indique la présence de l'enzyme oxydase chez la bactérie (oxydase +). (**Delarras, 2007**).

C) Test Mannitol-Mobilité :

Il permet de rechercher simultanément la fermentation du mannitol et la mobilité. L'utilisation du mannitol par la bactérie peut être révélée par le virage de l'indicateur de pH (le rouge de phénol) à sa teinte acide (jaune), alors que la texture semi-molle de ce gélose rend possible le déplacement des bactéries mobiles autour d'une piqûre centrale. (**Delarras, 2007**)

Les souches étudiées sontensemencées dans le milieu semi-solide mannitol-mobilité, par piqûre centrale .L'incubation est faite à $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 18 à 24h. (**Delarras, 2007**).

Le virage au jaune du milieu indique la fermentation du mannitol (mannitol +). (**Gerhard et al., 1994**)

L'éloignement de la bactérie de la ligne d'inoculation et la diffusion dans le milieu sont considéré comme un résultat positif (mobilité +). Le résultat est négatif (mobilité +) si la croissance reste limitée au point d'inoculation (**Marchal et al., 1991; Delarras, 2007**).

D) Test de TSI (Triple SugarIron agar):

Ce test vise à déterminer la capacité de la bactérie à dégrader un sucre donné (glucose, lactose ou sucrose) mis dans un milieu de base, avec ou sans production de gaz. Il vérifie ainsi la production du sulfure d'hydrogène (H₂S). (**Delarras, 2007**).

A l'aide d'une anse contenant des colonies prélevées, on ensemence le culot d'un tube par piqûre centrale, puis on inocule la pente en effectuant une strie sinueuse; l'incubation a été faite à $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 24h (**Delarras, 2007**).

Les résultats sont lus comme suit:

- ✓ Lactose positif: une coloration jaune de la pente.
- ✓ Glucose positif: une coloration jaune du culot.

- ✓ Culot et pente jaunes : Fermentation du glucose et un des deux autres sucres (lactose ou sucrose)
- ✓ Aucun sucre dégradé: pente rouge et culot rouge ou orange ;
- ✓ Production du gaz "CO₂ ou H₂": bulle(s) de gaz, milieu complètement séparé ou soulevé;
- ✓ Production de H₂S: précipité noirâtre plus ou moins abondant (**Marchal *et al.*, 1991; Delarras, 2007; Bougatoucha *et al.*,2010**)

II.4. Activité antimicrobienne:

L'effet antagoniste de l'extrait des cladodes d'opuntia ficus indica, est évalué par deux techniques de diffusion en milieu gélosé; la méthode des disques, et la méthode des puits.

Les deux techniques cherchent à déduire la concentration minimale inhibitrice "CMI", et la concentration minimale bactéricide/fongicide "CMB"; deux grandeurs qui donnent une estimation de l'effet antimicrobien du principe actif testé.

II.4.1. Méthode de diffusion (Antibiogramme)

Dans cette technique, on dépose des disques de papier imprégnés d'une quantité définie d'extrait testé et de ses dilutions, à la surface d'un milieu gélosé (Müller Hinton), préalablement ensemencé avec une suspension bactérienne en phase exponentielle de croissance.

Le principe de la méthode repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu solide dans une boîte de Pétri, avec création d'un gradient de concentration.

L'effet du produit antimicrobien sur le microorganisme cible, est apprécié après un certain temps de contact, par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition entourant la source d'agent antimicrobien. La souche sera qualifiée de sensible, très sensible, extrêmement sensible ou résistante (**Somaie *et al.*,2013**).

II.4.1.1. Activité antibactérienne:

✓ Préparation du milieu de culture

Le milieu de culture Muller-Hinton est utilisé pour apprécier l'activité antibactérienne des extraits des jeunes raquettes.

Il est préparé par la solubilisation de 38g de la poudre de gélose dans un litre d'eau distillée. Le mélange est bouilli avec agitation jusqu'à dissolution complète, puis auto-clavé pendant 15 minutes à 121°C et finalement coulé dans les boîtes de Pétri.

✓ **Stérilisation du matériel**

L'eau distillée, le milieu de culture, les tubes à essai utilisés dans la préparation des solutions bactériennes et les disques en papier Wattman (6 mm de diamètre) contenus dans un tube à essai, ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

✓ **Préparation des dilutions d'extrait:**

L'extrait mère d'opuntia ficus indica ayant une concentration de 60 mg/ml, a été stérilisé par un micro-filtre, puis dilué au demi à deux reprises successives pour préparer les concentrations des dilutions C/2 et C/4.

✓ **Préparation de l'inoculum**

L'inoculum bactérien est préparé comme suit:

- On racle à l'aide d'une anse de platine quelques colonies de 18h bien isolées et identiques de chacune des souches bactériennes à tester, préalablement ensemencées dans la gélose nutritive et incubées à 37°C/24 h.
- On décharge l'anse dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile 0,9%, et on homogénéise bien la suspension bactérienne.
- On calibre la suspension à une opacité équivalente à 0.5 Mc Farland ou à une DO de 0.08 à 0.10 à 625 nm, ce qui correspond à une concentration de 10^6 CFU/ ml). L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort. (OMS, 2008; Muanda, 2010; Harrar, 2012)

L'ensemencement doit se faire dans les 15mn qui suivent la préparation de l'inoculum

✓ **Ensemencement et dépôt des disques:**

L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage sur boîtes Pétri (OMS, 2008):

- Tremper un écouvillon dans la suspension bactérienne, puis l'essorer en pressant fermement sur la paroi interne du tube. L'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas en stries serrées.

- L'opération est répétée deux fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois, et l'ensemencement est fini en passant l'écouvillon une dernière fois sur toute la surface gélosée. L'écouvillon est rechargé à chaque fois qu'on ensemence plusieurs boîtes de Pétri avec la même souche.
- Les disques imbibés d'extrait et de dilutions, sont déposés délicatement sur la surface de la gélose inoculée à l'aide d'une pince stérile.
- De même, les disques Wattman imprégnés d'eau distillée présentent le témoin négatif.
- Finalement, les boîtes de Pétri sont incubées pendant 18 à 24 heures à 37°C.

Pour obtenir des résultats fiables, l'expérience est répétée en triplicata pour chaque espèce bactérienne, afin d'établir une moyenne dans les mesures du pouvoir inhibiteur de l'extrait testé.

✓ Lecture des antibiogrammes

Selon **Ponce et al., (2003)**, la lecture des antibiogrammes a été faite par la mesure des diamètres des halos d'inhibitions au tour des disques à l'aide d'un pied à coulisse. Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peuvent être symbolisés par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis l'extrait testé:

- Non sensible (-) ou résistante : diamètre < 8mm.
- Sensible (+) : diamètre compris entre 9 à 14 mm.
- Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 à 19 mm.
- Extrêmement sensible (+++) : diamètre > 20mm.

Les plus petites concentrations auxquelles les extraits présentent encore une activité antibactérienne visible à l'œil nu déterminent les concentrations minimales inhibitrices (CMI).

Après détermination de la CMI, et pour la détermination des concentrations minimales bactéricides (CMB) un prélèvement à l'anse est réalisé autour de chacun des disques ne présentant aucune culture visible. Chaque prélèvement est déposé en strie sur gélose Mueller-Hinton, et la boîte ensemencée est incubée 24 heures à 37°C. (**Harrar, 2012**)

II.4.1.2. Activité antifongique

Les mêmes opérations sont effectuées avec les souches des champignons, mais dans ce cas le milieu de culture utilisé est le milieu Sabouraud.

Les champignons sont activés pendant 7 jours dans des boîtes de Pétri à une température de 30°C, et leur inoculum est ajusté de la même façon que les bactéries pour avoir une charge de (10^5 CFU/ ml). L'ensemencement est ensuite réalisé par écouvillonnage sur boîtes Pétri coulés qui contiennent du Sabouraud. La lecture des antibiogrammes est faite après 48 heures d'incubation à 36 °C pour les levures, et 72 heures d'incubation à 30°C pour les champignons. **(Muanda, 2010; Harrar, 2012)**

La CMI et la CMF (concentration minimale fongicide) sont déterminées d'une manière similaire à celle des bactéries, tout en respectant les conditions d'ensemencement des champignons.

II.4.2. Méthode de diffusion en milieu gélosé par les puits:

La méthode de diffusion par les puits consiste à découper des troncs circulaires verticaux dans la gélose et d'y verser un volume précis de l'extrait et de ses dilutions de concentrations connues.

II.4.2.1. Technique

La gélose appropriée pour les bactéries et les champignons, est coulée en boîte de Petri de 90 mm de diamètre sur une épaisseur de 4mm, pour être ensemencée par écouvillonnage de la surface par la suspension bactérienne avec une densité de 10^7 UFC /ml. Les boîtes sont ensuite mises à sécher pendant 15 minutes à température ambiante.

Des cavités (puits) de 5mm de diamètre, et espacées de 24 mm, sont aménagées à l'aide d'une pipette dans la gélose, puis remplies avec (50µl) du produit à tester. Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant 24 heures.

Le témoin négatif a été préparé en remplaçant l'extrait des cladodes avec de l'eau distillée stérile.

II.4.2.2. Lecture

L'action du produit se manifeste par la formation d'une auréole d'inhibition autour du puits. Un produit est considéré actif, s'il donne un diamètre d'inhibition supérieur à 8 mm **(ElShaer et Ghanem, 1996)**.

La lecture des antibiogrammes a été faite par la mesure des diamètres des halos d'inhibitions au tour des disques à l'aide d'un pied à coulisse. Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peuvent être symbolisés par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis des extraits **(Ponce et al., 2003)**.

De même que la technique des disques, nous avons réalisé trois essais pour chaque souche pour s'assurer de la validité des résultats trouvés.

Chapitre II :

Résultats et discussion

III. Préparation de l'extrait des jeunes cladodes d'*Opuntia Ficus Indica*:

III.1. Caractérisation des cladodes:

Les jeunes raquettes du genre inerme d'*Opuntia ficus indica* de la région de Oued Lili, renferment un taux d'humidité de l'ordre de 93%, une valeur qui se concorde avec le taux de 91-93%, rapporté par **Hadj Sadok et al., (2008)** pour ce stade de croissance, mais elle reste tout de même supérieure aux résultats enregistrés par **Chiteva et Wairagu, (2013)** (87%) et **Abdessemed et al., (2014)** (91.9%).

En général, la teneur en eau des cladodes est comprise entre 80 et 95% **Ulises-Osuna et al., (2014)**, où elle varie en fonction du site de culture, des saisons et de l'âge de la plante (**Retamal et al., 1987**). Par conséquent, les valeurs respectives varient à la fois entre les espèces et les variétés et ne doivent pas être considérées comme des valeurs absolues (**Rodriguez-Felix, 2002**).

Tableau 02 : Les taux d'humidité et de la matière sèche des cladodes

Paramètre	Teneur (%)
Eau	93 ± 0,1
Matière sèche	7 ± 0,1

III.2. Extraction des polyphénols:

La préparation des extraits à partir des raquettes d'*Opuntia Ficus Indica* a été effectuée Sur 5 g de poudre, selon la méthode de **Rsaissi et al.,(2013)** (avec des modifications mineures).

Le rendement d'extraction méthanolique trouvé était de (**6,11 ± 0,105 % (m/m)**), une teneur largement supérieure à celle enregistrée par **Amara et al., (2016)** (**0,821 ± 0,167%**), mais pas loin du résultat trouvé par **Bari et al., (2012)** qui a été (**4.60 ± 0.23%**).

Cette différence peut être expliquée principalement par la variation du matériel végétal utilisé, dont la provenance, l'âge et la période d'échantillonnage modifie la composition en polyphénols. La technique d'extraction employée est un autre facteur qui affecte vraisemblablement le rendement d'extraction.

III.3. Caractérisation phytochimique :

Les analyses de caractérisation phytochimique, réalisés sur notre extrait pour quantifier ses substances naturelles bioactives, ont donné les résultats présentés dans le tableau qui suit :

Tableau N°03 : Taux des polyphénols et des flavonoïdes de l'extrait des cladodes.

Paramètres	Teneur
Polyphénols totaux (mgEAG/g)	40,18± 0,9
Flavonoïdes (mgEQ/g)	4,09± 1,12

mgEAG/g : milligramme Equivalent d'Acide Gallique/gramme.

mgEQ/g : milligramme Equivalent Quercitainne/gramme.

III.3.1. Dosage des polyphénols totaux:

La détermination de la teneur en polyphénols totaux de l'extrait a été réalisée selon la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu.

La quantité des polyphénols correspondante a été rapportée en équivalent milligramme d'acide gallique et déterminé par l'équation de type :

$$y = 0.0061x - 0.0017 \text{ sachant que } R^2 = 0.9804. (\text{Tableau 03})$$

La teneur des polyphénols notée pour l'extrait méthanolique de la poudre des nopales est égale à **40,18± 0,9 mg EAG/g d'extrait**, cette valeur comparable à la valeur 41,6 donnée par **Hadj sadok et al., (2008)**, est supérieure à celle **35,2 ± 0,64 EAG/g** trouvée par **Amara et al., (2016)**.

La divergence entre les résultats peut être argumentée par la différence des sites de culture et des protocoles utilisés. (**Amara et al., 2016; Boutakiout, 2017**)

III.3.2. Dosage quantitative des Flavonoïdes:

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode au trichlorure d'aluminium (AlCl₃) et l'étalon été la quercétine. La teneur en flavonoïdes exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine (mg EQ), a été obtenu à partir de la courbe d'étalonnage qui suit une équation de type: $y = 20.5x - 0.01$ sachant que $R^2 = 0.9899$

Les résultats du dosage des flavonoïdes (**Tableau 03**) révèlent que l'extrait alcoolique des cladodes contient **4,09± 1,12mg EQ/g d'extrait**, une quantité semblable à celle affichée par **Amara et al., (2016)** et qui est de **4,93 ± 0,224 mg EQ/g d'extrait**.

IV. La vérification des souches:

La série d'examens adoptées dans cette étude, cible à mettre au point une identification précise des paramètres morphologiques et biochimiques des microorganismes expérimentés:

IV.1. Aspect macroscopique :

Les résultats de l'apparence phénotypique des colonies des cultures microbiennes utilisées, sont rassemblés dans le tableau suivant:

Tableau 04: caractéristiques macroscopiques des souches

Souche	Forme	Couleur
<i>E. coli</i>	colonies bombé	Violet foncée
<i>S.aureus</i>	colonies bombé	Doré
<i>B. cereus</i>	Crénelé	Turquoise
<i>B. subtilus</i>	Forme irrégulière	Blanc crème ou jaune
<i>Pseudomonas aerogenosa</i>	ronde	Vert de gris
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	forme irrégulière	Blanc crémé
<i>Aspergillus niger</i>	Aucune forme	Noir
<i>Candida albicans</i>	Aucune forme	Blanc crème

IV.2. Aspect microscopique:

IV.2.1. Etat frais et coloration de Gram:

L'état frais permet de mettre en évidence les critères morphologiques et la mobilité des souches observées, alors que la coloration de Gram offre des renseignements rapides sur les propriétés de la paroi bactérienne. Le tableau suivant réunit les résultats trouvés:

Tableau 05 : Résultats des caractéristiques microscopiques des souches étudiées.

Souches	Forme	Mode de groupement	Mobilité	Gram
<i>E. coli</i>	Coccobacille	En chaînette	Mobile	Négatif
<i>S.aureus</i>	Coque	en amas, en grappe de raisin	Immobile	Positif
<i>Bacillus subtilus</i>	Irrégulière	Bâtonnet droit	Mobile	Positif
<i>Bacillus cereus</i>	Bâtonnet	Bâtonnet	Mobile	Positif
<i>Pseudomonas aerogenosa</i>	Bacille fins droit	Isolée	Mobile	Négatif
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Bâtonnet aux extrémités arrondies	Courte chaîne	Immobile	Positif

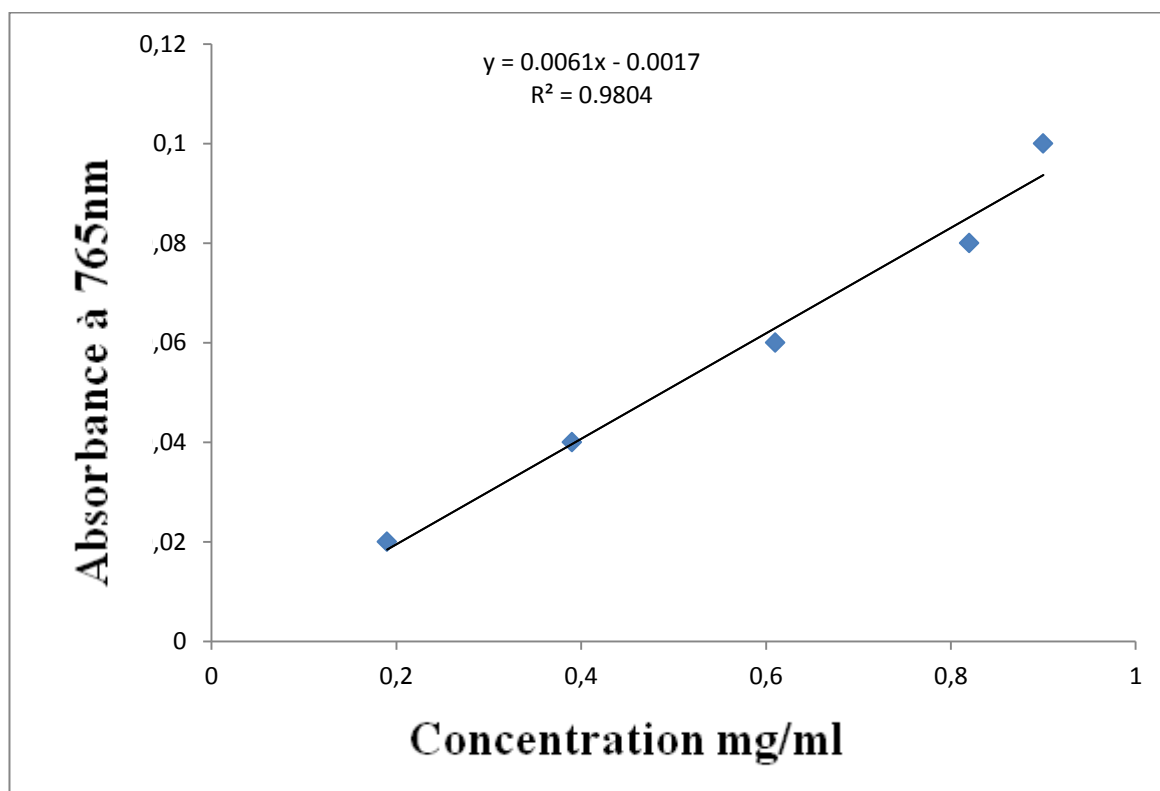


Figure 03: La courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

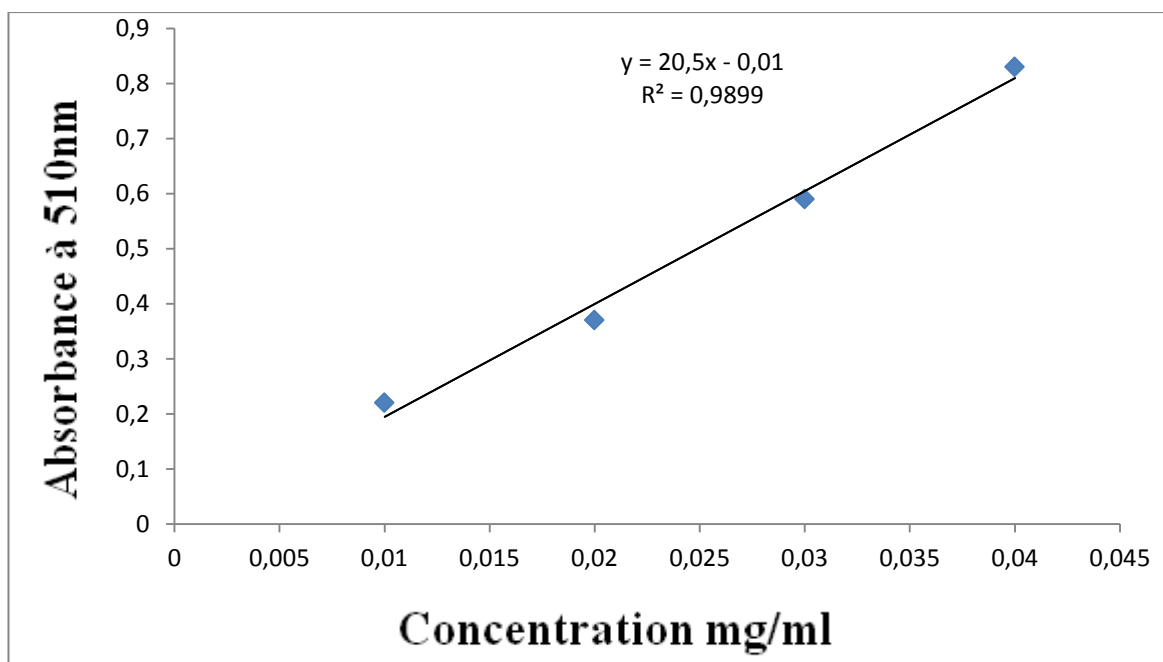


Figure 04: La courbe d'étalonnage de laquercétine.

IV.3. Les tests biochimiques:

Les résultats des tests biochimiques, appliqués aux souches étudiées, sont regroupés au niveau du tableau N°06:

Tableau N°06: Résultats des tests biochimiques

Caractères Biochimiques	Mannitol-Mobilité		Oxydase	Catalase	TSI			
	Mannitol	Mobilité			glucose	lactose	H2S	Gaz
<i>E. coli</i>		+	-	+	+	+	-	+
<i>S.aureus</i>	+	-	-	+	+	+	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	Variable	+	+	+	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	+	-	+	+	-	-	-
<i>Pseudomonas aerogenosa</i>	+	+	+	+	-	-	-	+

Les données d'Avril *et al.*, (1992) et de Flandrois, (1997), ainsi que les informations de Grosjean *et al.*, (2011) et de Ripert,(2013) confirment nos résultats ,et garantissent alors la vérification de l'identité de toutes les souches examinées.

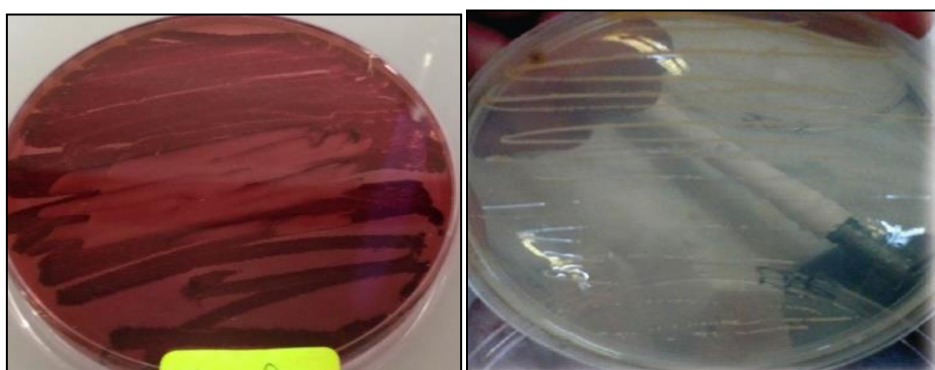
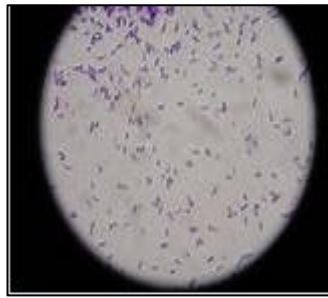
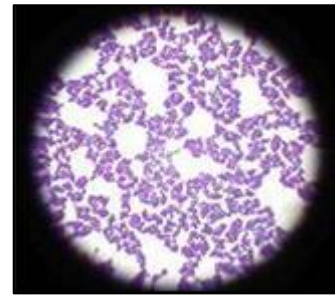
*E.Coli**S.Aureus*

Figure 05: Exemples d'aspects macroscopiques des souches testées.

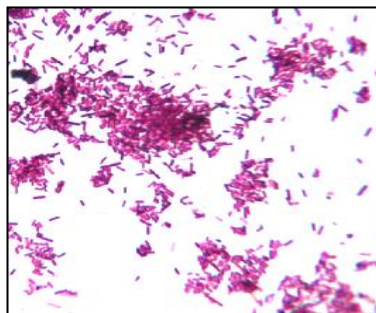


Bacillus subtilis

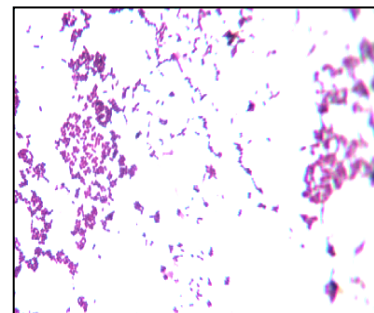


Staphylococcus aureus

Figure06: Exemples de l'état frais sous microscope optique (G x 40)



(a)



(b)

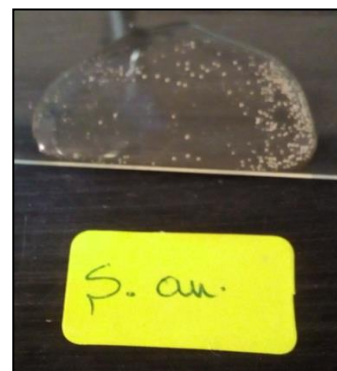
Figure 07: Photo d'une souche (a) Gram positif (*Bacillus cereus*) et (b) Gram négatif (*E. coli*) vues par microscopie photonique (G x100)



TSI



Oxydase



Catalase



Mannitol Mobilité

Figure08: exemples des résultats positifs des tests biochimiques

V. L'activité antimicrobienne de l'extrait:

Nous avons étudié *in vitro* le pouvoir antimicrobien de l'extrait isolé des jeunes cladodes d'*Opuntia ficus indica*, par la méthode d'antibiogramme sous ses deux variantes: les disques et les puits. Cette méthode de diffusion sur milieu gélosé solide, utilise le Mueller-Hinton pour les bactéries et le Sabouraud pour les champignons. (Harrar, 2012)

L'activité antimicrobienne de l'extrait a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques ou des puits contenant l'extrait à tester vis-à-vis de cinq (5) germes pathogènes dont trois (3) bactéries Gram + et deux (2) Gram -, une souche bénéfique Gram +, et deux (2) champignons; à savoir une moisissure et une levure.

V.1. La méthode des disques:

Les observations effectuées sur l'effet d'extrait mère des raquettes de figuier de barbarie et de ses dilutions sur la croissance des souches testées par la méthode des disques sont représentées dans le tableau N°07:

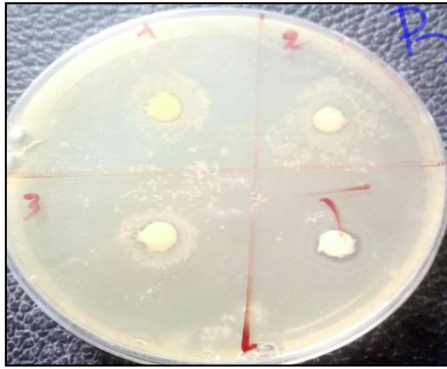
Tableau N°07 : Résultats de l'antibiogramme par la méthode des disques.

Les souches	SM		D1		D2		Eau distillée (témoin)	
	Diamètre (mm)	Résultat	Diamètre (mm)	Résultat	Diamètre (mm)	Résultat	Diamètre (mm)	Résultat
<i>E. coli</i>	9	+	9	+	7	-	0	-
<i>S.aureus</i>	0	-	0	-	0	-	0	-
<i>Bacillus subtilis</i>	0	-	0	-	0	-	0	-
<i>Bacillus cereus</i>	0	-	0	-	0	-	0	-
<i>Pseudomonas aerogenosa</i>	14	+	10	+	0	-	0	-
<i>Candida albicans</i>	9	+	0	-	0	-	0	-
<i>Aspergillus niger</i>	0	-	0	-	0	-	0	-

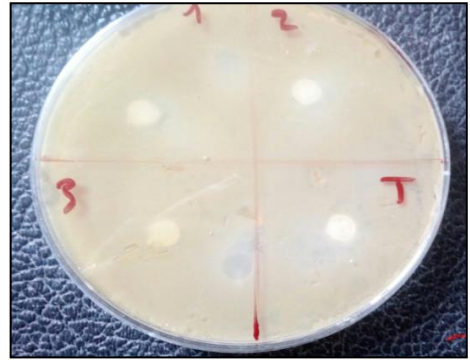
Dont :

SM : solution d'extrait mère, **D1** : la première dilution, **D2** : la deuxième dilution

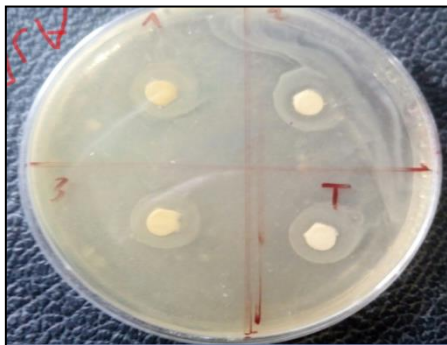
(+): souche sensible (-) : souche résistante



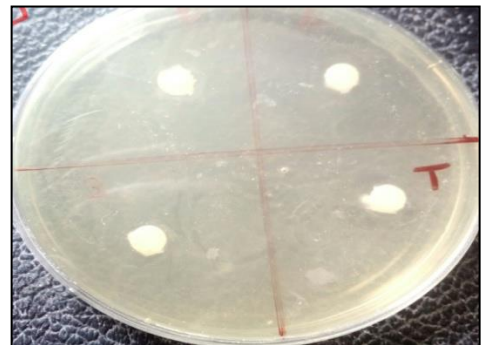
Pseudomonas aerogenosa



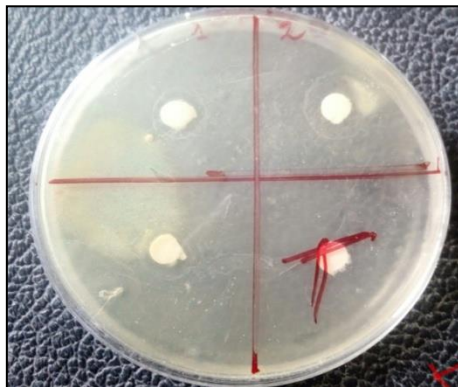
Candida albicans



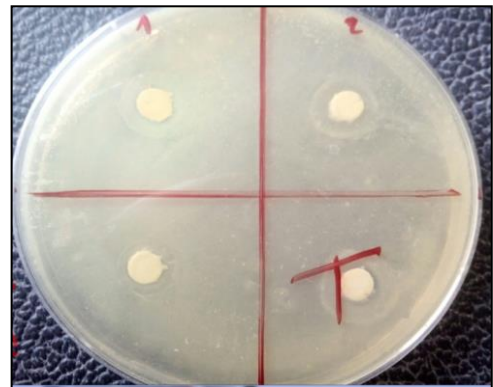
Aspergillus niger



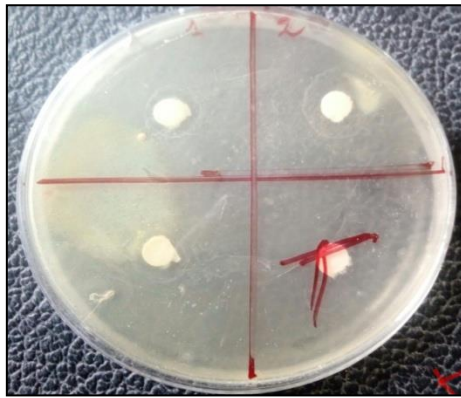
B. cereus



S.aureus



E. coli

*Lactobacillus acidophilus**B. subtilis***Figure 09:** Résultats de l'antibiogramme par les disques.

Dont :

1 : SM : la solution mère .

2 : D1 : la première dilution.

3 : D2 : la deuxième dilution.

V.2. La méthode des puits:

Le tableau N°08 résume les résultats remarquables sur l'effet d'extrait suscité sur le développement des souches testées par la méthode des puits:

Tableau N°08 : Résultats de l'antibiogramme par la méthode des puits

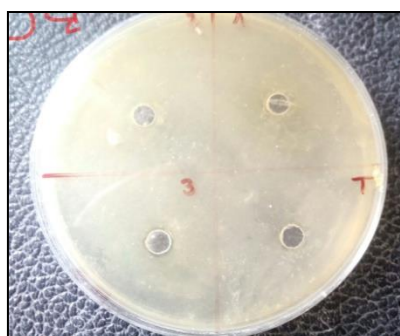
Les souches	SM		D1		D2		Eau distillée (témoin)	
	Diamètre (mm)	Résultat	Diamètre (mm)	Résultat	Diamètre (mm)	Résultat	Diamètre (mm)	Résultat
<i>E. coli</i>	0	-	0	-	0	-	0	-
<i>S.aureus</i>	0	-	0	-	0	-	0	-
<i>Bacillus subtilis</i>	0	-	0	-	0	-	0	-
<i>Bacillus cereus</i>	0	-	0	-	0	-	0	-
<i>Pseudomonas aerogenosa</i>	7	-	7	-	7	-	0	-
<i>Candida albicans</i>	0	-	0	-	0	-	0	-
<i>Aspergillus niger</i>	0	-	0	-	0	-	0	-

Les résultats des deux examens, montrent que l'extrait des jeunes cladodes d'*Opuntia ficus indica* est avéré actif contre les deux bactéries *E. Coli* ATCC 25922 et *P.aerogenosa* ATCC 27853, et contre la levure *Candida albicans* ATCC 10231.

Par contre, les bactéries *S. Aureus* ATCC 33862, *B. Cereus* ATCC 10876, *B. Subtilus* ATCC 6633 et *L. acidophilus*, accompagnées de la moisissure *Aspergillus niger* ATCC 106404 se montrent résistantes vis à vis l'extrait jeunes des cladodes.

Nos résultats sont en accord avec ceux d'**Amara et al., 2016** pour *S. Aureus* où la bactérie est très résistante contre l'extrait des cladodes du figuier de barbarie, mais en contradiction avec les résultats de **Harrar, (2010)** pour la même souche mais avec un extrait phénolique d'une autre plante médicinale.

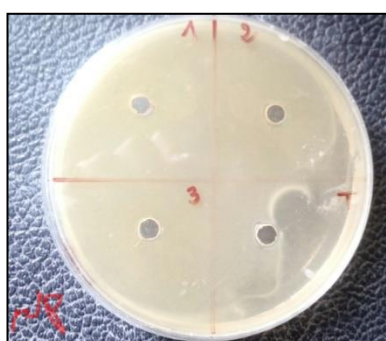
Or, on controverse les données du même auteur pour *E. Coli*, qui est sensible à l'extrait analysé dans notre étude; un résultat qui s'accorde avec les travaux de **Dhaouadi et al., (2013)**



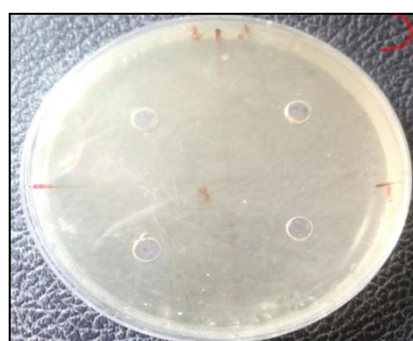
Bacillus cereus



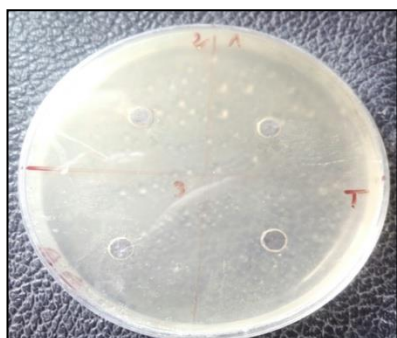
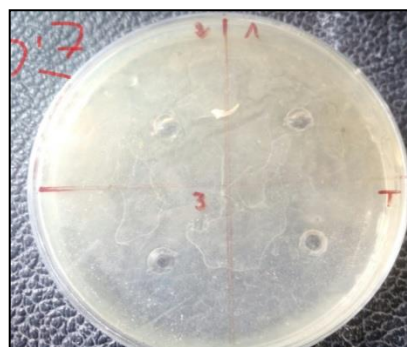
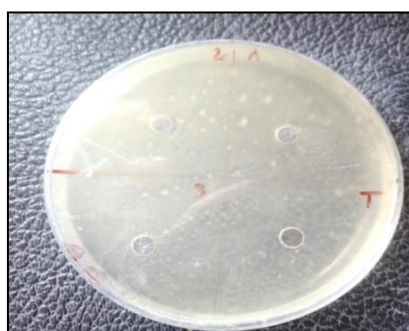
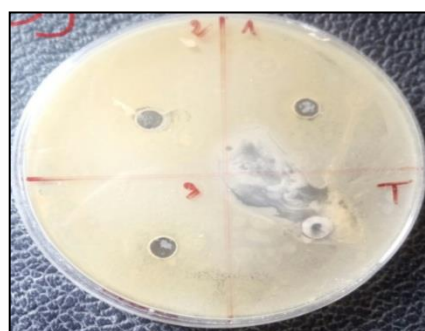
Lactobacillus acidophilus



Aspergillus niger



Bacillus subtilus

*Pseudomonas aerogenosa**E. coli**Staphylococcus aureus**Candida albicans***Figure 10:** Résultats de l'antibiogramme par les puits.

Dont :

SM : solution mère.

D1 : la première dilution.

D2 : la deuxième dilution.

sur **Opuntia Ficus Indica**, et de **Harrar, (2010)**, dont les deux germes *E. Coli* et *P.aerogenosa* sont inhibées par d'autres phyto-extraits polyphénoliques.

La levure *Candida albicans* quant à elle, présente une sensibilité envers les polyphénols, marqué par d'autres études comme c'était noté par **Muanda, (2010)** avec une concentration microbienne minimale inhibitrice de 150 µg/ ml.

La détermination de l'effet bactériostatique, fongistatique et le vostatique de l'extrait se mesure par la concentration minimale inhibitrice (CMI); c'est la plus petite concentration capable d'inhiber la croissance visible d'une population bactérienne (**LeLoir et Gautier, 2009**), plus la CMI est faible, plus l'antibactérien est actif (**Nicolas et Daniel, 1998 ; Nejjah et al., 2006**).

Son effet bactéricide, fongicide et levocide est déterminé par la concentration minimale bactéricide (CMB) et la concentration minimale fongicide (CMF); définies comme les plus petites

concentrations entraînant la destruction de 99,99 % de l'inoculum bactérien et fongique, respectivement. (**Le Loir et Gautier, 2009**).

Les CMI enregistrées pour les souches sensibles sont de l'ordre de 30mg/ml pour les deux bactéries, et de 60mg/ml pour la levure. Outre, on n'a pas pu estimer la CMB, qui demeure une concentration supérieure à la concentration mère de l'extrait analysé.

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) exprimées par **Harrar, (2010)** ont été de 6,25 mg/ml pour **E.coli**, et 0,2 mg/ml pour **P.aeruginosa**. **Ben ammar et al. (2008)** ont trouvés des valeurs de CMI d'extrait méthanolique d'une autre plante, supérieure à 6 mg/ml avec les souches d'**E.coli**

La différence des résultats est attribuée probablement à la différence existante entre les souches utilisées, la partie de la plante analysée et son stade de maturité.

A l'égard des causes susmentionnées susceptibles d'affecter l'activité antimicrobienne de notre extrait, l'origine la plus éventuelle est sans doute la technique d'extraction adoptée, qui influence directement la quantité et le profil des métabolites secondaires soustraits, dans lesquels, certaines classes seulement sont dotées d'effet antimicrobien.

Cowan (1999) a rapporté que les différentes classes de polyphénols essentiellement les tanins et les flavonoïdes peuvent augmenter la toxicité des extraits envers les microorganismes. Cette toxicité est fonction du site de groupements hydroxyles et augmente avec l'augmentation de leur nombre sur le composé phénolique. L'effet antimicrobien de ces phénols peut être expliqué par l'inhibition de la croissance bactérienne suite à leur adsorption sur les membranes cellulaires, l'interaction avec les enzymes et les effecteurs ou la privation en substrats et ions métalliques (**Dhaouadi et al., 2010**).

Les gallotannins ont une activité antibactérienne intense vis-à-vis des **Salmonelles** et **Bacillus cereus**. La quercétine et la naringénine présentent une forte activité antibactérienne envers une large gamme de bactéries. La catéchine et l'épicatéchine ne montrent aucune activité antibactérienne exceptée pour **Pseudomas aerogenosa**. A l'inverse, certains dérivés gallates sont actifs contre l'ensemble des micro-organismes testés (**Collin et al., 2011**).

Il a été rapporté que l'activité antimicrobienne chez d'autres plantes est dû à la présence d'antraquinones (**Comini et al., 2011; Doughari et al., 2012**). Les stilbènes sont connus depuis longtemps pour leurs propriétés antifongiques. (**Jeandet et al., 2002**).

L'efficacité optimale d'un extrait peut ne pas être due à un constituant actif majoritaire, mais plutôt à l'action combinée (synergie) de différents composés (**Essawi et Srour, 2000**).

Le mécanisme des effets antimicrobiens des polyphénols est sans doute très complexe. Parmi les hypothèses avancées, l'inhibition de la synthèse d'acide nucléique, l'altération des fonctions de la membrane cytoplasmique, la séquestration de substrats nécessaires à la croissance microbienne et l'inhibition du métabolisme énergétique microbien (**Jungkind,1995**).

Conclusion générale

Le figuier de Barbarie, scientifiquement appelé « *Opuntia Ficus Indica* », est une plante médicinale mexicaine introduite en Afrique du Nord au 17^{ème} siècle, et dont l'existence en Algérie est restreinte à des cultures spontanées géographiquement dispersées.

Peu exigeante et parfaitement adapté à la sévérité du climat sec, cette espèce appartenant à la famille des Cactacées est sous-estimée localement malgré son potentiel médical, alimentaire, ornemental et écologique, et son exploitation est limitée à la production du fruit ou à son rôle de brise-vent et d'aliments de bétails chez les fermiers.

Quant à sa tige mutée en cladodes à forme de raquettes, elle est gorgée d'essences naturelles et de métabolites secondaires ayant un potentiel thérapeutique aussi méconnu que le reste de cette plante succulente.

Cette étude s'oriente alors, vers la mise en valeur de la partie aérienne d'opuntia, et à la connaissance du potentiel antimicrobien de cette plante.

Quantitativement, l'évaluation du contenu des polyphénols totaux en adoptant la méthode de Folin-Ciocalteu révèle la présence des quantités moyennement importantes en polyphénols. De même nous avons dosé les flavonoïdes par la méthode d'AlCl₃ qui nous mène à conclure que cette plante contient une quantité considérable de flavonoïdes.

Au terme de ce travail nous avons utilisé l'extrait des jeunes cladodes d'opuntia ficus indica comme antibiotique naturel pour le traitement des maladies infectieuses causées par des souches pathogènes, bénéfiques et des moisissures. En effet, nos résultats montrent que l'extrait méthanolique des jeunes cladodes exerce un effet inhibiteur contrasté sur *E.Coli*, *pseudomonas Aergenosa* *Candida albicans*.

Le bilan finale sur une plante aussi emblématique, mais toujours abandonnée, que le figuier de barbarie, nous suscite de mener en perspective une poursuite d'étude sur tous les paliers pharmacologiques possibles de ses cladodes en particulier.

Les résultats des travaux précédents sur leur qualité nutritionnelle; supérieure même à celle de la laitue, et les expérimentations actuelles dirigées vers le dévoilement de leurs capacités thérapeutiques et médicales, plaident que ces raquettes méritent d'être introduites dans le régime alimentaire local comme étant des aliments fonctionnels à double effet : nutritif/curatif.

Références bibliographiques

Références bibliographiques.

Références bibliographiques:

A

1. **Abdessemed .D, Nezari .M, Mohamed Hadj .A. R, Abdessemed .DJ, Bahadi .F et Halitim. A ;(2014) :** Emulsifying effect of pectin from *Opuntia ficusindica* Cladode. Vol 6(12):198-201
2. **Amara. F, Guenfoud. F, Kharchi. B, (2016):** Etude de l'activité antibactérienne des cladodes du figuier de barbarie <<*Opuntia ficus indica*>> sur *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* :mémoire de master.
3. **Audigie. C, Figarella. J et Zonszain .F, (1978):** Manipulation d'analyse biochimique. Doin Edition, Paris. P 247.
4. **Avril J. L, Denis. F, Monteil. M ;(1992):** Bactériologie Clinique, 2eme édition Doin Paris: 9-13, 16-20,155-158

B

5. **Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunet C., Dine T., Luyckx M., Vasseur J., Cazin M., Cazin J. C. et Pinkas M, (1996):** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arznei. Forschung.*; 46: 1086-1089.
6. **Bari. M.N, Zubair .M, Rizwan. K, Rasool. N, Bukhari.H, Akram S, Bokhari T.H, Shahid. M, Hameed. M et Viqar .U.A ;(2012) :** Biological Activities of *Opuntia Monacantha* Cladodes. *J. Chem. Soc. Pak.* Pp 990-995
7. **Berche P, Gaillard J-L, Simonet M, (1989):**Bactériologie: bactéries des infections humaines edition Médecine-Sciences Flammarion.Paris :100-103.
8. **Bougattoucha .W et Boudelaa. Y, (2010):** L'examen cyto bactériologique des urines. Ecole de formation paramédicale de Skikda Algérie.
9. **Bruneton, J .(1999).** Pharmacognosie, phytochimie, plante médicinale, (3eme éd). Editions Tec & Doc Lavoisier, p1120
10. **Berche. P, Gaillard .J.L ; Simonet. M ; (1989):** Bactériologie; Bactéries des Infections Humaines, édition Médecine – Sciences - Flammarion. Paris : 100-103

C

11. **Chiteva.R et Wairagu.N ;(2013) :** Chemical and nutritional content of *Opuntia ficus-indica* (L.).vol.12(21), pp.3309-3312
12. **Collin, S., & Crouzet, J. (2011).** Polyphénols et procédés. *Edition Lavoisier TEC & DOC*, p 5 ,13 , 16 , 235.
13. **Cowan, M. M. (1999).** Plant Products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12 (4), 564 – 582.

Références bibliographiques.

14 .Comini L. R., Nez Montoya S. C., Éez P. L., Argello G. A., Albesa I. and Cabrera J. L. Antibacterial activity of anthraquinone derivatives from *Heterophyllaea pustulata* (Rubiaceae). *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* 2011; 102: 108-114.

D

15. Delarras.C,(2007) :Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou decontrôle sanitaire .Edition Tec&Doc, Lavoisier, paris.

16.Dhaouadi .K, Raboudi .F, Funez-Gomez. L, Pamies. D ,Estevan.C, Hamdaoui. M ET Fattouch.S ;(2013) : Polyphenolic Extract of Barbary-Fig (*Opuntia ficus-indica*) Syrup: RP–HPLC–ESI–MS Analysis and Determination of Antioxidant, Antimicrobial and Cancer-Cells Cytotoxic Potentials. vol. 6:45–53

E

17. El-shaer.E, Ghanem.S, (1996): Antimicrobial evaluation and chromatographic analysis of some essential and fixed oils. *Pharmazie*51 :993-995.

18.Essawi T. and Srour M. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *J. Ethnopharmacol.* 2000; 70: 343-349.

G

19.Grosjean.J, Clave.D, Archambaud.M, Pasquier.C ;(2011) : bactériologie et virologie pratique, 2éme Ed Révisée paris : p73.

20.www.google.fr/maps/place/Oued+Lili

H

21. Hadj Sadok T. Aid.F, Bellal.N et Abdul Hussain.N.S ; (2008) composition chimiques des jeunes cladodes d'OPUNTIA FICUS INDICA et possibilistes de valorisation alimentaire.agricultura-StiinNa si pratica.p 39-48.

22.Harrar Abd El Nacer, (2012):Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnusalaternus* L. Thèse de Magister

J

23.Jungkind DL. **Antimicrobial resistance** : a crisis in health care ; [based on the proceedings of the Eastern Pennsylvania Branch of the American Society of Microbiology Symposium on Antimicrobial Resistance: a Crisis in Health Care - Clinical Laboratory and Epidemiologic Considerations, held November 11-12, 1993, in Philadelphia, Pennsylvania]. Ed. Plenum Press, New York, NY [u.a.], 1995, p. 248.

Références bibliographiques.

K

24. Kanoun.K, BelyagoubiB.N, Ghembaza.N, et AtikBekkara. F, (2014): Comparative studies on antioxidant activities of extracts from the leaf, stem and berry of *Myrtus communis* L. International Food Research Journal 21(5):1957-1962.

L

25. Le loir et Michel Gautier ;(2009) : *staphylococcus aureus*, Tech & Doc – Lavoisier .p13

26. Levy,S.B (2001). Antibiotic Resistance: consequences of infection p 124

M

27. Marchal. L ; Bourdon .J.L et Richard. C, (1982) : Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries .Ed. Doin paris.

28. Muanda François Nsemi, (2010): Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques.

N

29. Nejjah.F, Ouhsine.M, Srhiri.A.A, El Yachioui.M. et Hajjaji .N ;(2006) : Activité inhibitrice de la N.hexadécylbétaine sur *Staphylococcus aureus*. Bull.Soc.Pharm.Bordeaux, 145,85-90.

30. Nicolas.M et Daniel.C ;(1998) : Activités technologiques en microbiologie - Techniques de base et méthodologie. Editeurs CRDP D'Aquitaine-Bordeaux, pp152.

O

31. OMS 2010 in bapio V.E.G 2007. Contribution à l'évaluation de la résistance aux insecticides des vecteurs du paludisme et de distribution de gène Kdr au Burkina Faso. Thèse de doctorat en biologie appliquée et modélisation du système biologique

P

32. Ponce A.G, Fritz.R, Del Valle. C et Roura S.I, (2003): Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. Lebensmittelwissenschaft und Technologie. Pp500-508.

R

33. Retamal N., Duran J.M. & Fernandez J. 1987. Seasonal variations of chemical composition in prickly pear (*Opuntia ficus indica* L. Mill.). Journal of science food agricultural. 38: 303-311.

34. Ribéreau-Gayon J, Peynaud m, Ribéreau-Gayon P and Sudraud P. Sciences et techniques du vin. Tome 1, analyse et contrôle des vins. Ed. Dunod, Paris, 1972, p. 671

Références bibliographiques.

35. Ripert Christian, (2013): *Mycologie médicale*

36.Rsaissi. N, Bouhache .M et Bencharki .B, (2013) : Potentiel allélopathique du figuier de barbarie « *Opuntia ficus-indica*(L.) Mill » sur la germination et la croissance du jujubier «*Ziziphus lotus* (L.) Des f.» *International Journal of Innovation and Applied Studies*.pp. 205-214.

S

37. Somaie. S, Ashraf .K et Zahra. H, (2013) :Antimicrobial activity of methanol extract of *Opuntia stricta* F. Vol, 7 (12): 907-910

T

38. Teixeira da Silva J. A,(2004): Mining the essential oils of the Anthemideae. *Afr. J. Biotechnol.*; 3: 706-720

U

39.Ulises Osuna-Martinez, Reyes-Esparza.J et Rodriguez Fragazo.L; (2014): Cactus (*Opuntia ficus-indica*): A Review on its Antioxidants Properties and Potential Pharmacological Use in Chronic Diseases. *Natural Products Chemistry & Research* Volume 2 • Issue 6 1000153.

Annexes

Annexe N°01: Milieux de culture.

➤ **Mueller Hinton**

Composition

Extrait de viande de bœuf : 2.0g.

Peptone de caséine : 17.5g.

Amidon de maïs : 1.5g.

Agar : 17.0g.

PH : 7.4.

Préparation

- Mettre en suspension 38,0 g de milieu déshydraté (BK048) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.
- Répartir en tubes ou en flacons.
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

➤ **Sabouraud.**

Composition:

Peptone : 10,0 g.

Glucose massé : 20,0 g.

Agar : 15,0 g.

pH = 6,0.

Préparation :

- Mettre en suspension 61,4g de milieu déshydraté(BK025) dans un litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.
- Répartir en tubes ou en flacons.
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

➤ **Baird Parker (BP)**

Composition :

Peptone : 10,0 g

Extrait de viande de bœuf : 4,0 g

Extrait de levure : 2,0 g

Pyruvate de sodium : 10,0 g

Glycocolle : 12,0 g

Chlorure de lithium : 5,0 g

Agar-agar : 20,0 g

Préparation

- Mettre en suspension 54,9 g de milieu de base déshydraté (BK055) dans 900 mL d'eau distillée ou déminéralisée.
- Porter à ébullition lentement, en agitant jusqu'à dissolution complète.
- Répartir en flacons, à raison de 90 ml par flacon.
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

➤ **EMB (Eosine Bleu de Méthylène)**

Composition

Peptone : 10,0 g

Eosine : 0,4 g

Bleu de méthylène : 0,0625 g

Hydrogénophosphate de potassium : 2,0 g

Agar : 15,0 g

pH : 6,8

Préparation

- Mettre en suspension 37,5 g de milieu déshydraté (BK056) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.
- Répartir en tubes ou en flacons.
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

➤ **TSI (Triple Sugar Iron)**

Composition

Peptones de caséine : 15g/l

Peptones de viande : 5g/l

Extraits de viande : 3g/l

Peptones de levure : 3g/l

NaCl :5g/l

Lactose :10g/l

Saccharose :10g/l

Glucose :1g/l

Citrate ammoniacal de Fer (III) : 0,5g/l

Thiosulfate de sodium : 0,5g/l

Rouge de phénol : 0,024g/l

Agar :12g/l

Préparation

- Mettre en suspension 60,1 g de milieu déshydraté (BK059) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.
- Répartir en tubes.
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.
- Incliner les tubes de manière à obtenir un culot de 3 cm de hauteur et une pente oblique.

➤ **Milieu Mannitol-Mobilité**

Composition

Hydrolysate trypsique de caséine: 10,0 g

Mannitol: 7,5 g

Rouge de phénol: 0,04 g

Nitrate de potassium: 1,0 g

Agar : 3,5 g

PH : 7,6

Préparation

- Mettre en suspension 22 g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.
- Répartir en tubes.
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

➤ **Technique de coloration de Gram**

- Recouvrir le frottis par violet de Gentiane pendant une minute ;
- Rejeter le violet en l'entraînant avec la solution de lugol mordant pendant une minute ;
- Faire décolorer la lame inclinée par l'alcool jusqu'à ce que la dernière goutte soit non colorée ;
- Rincer par l'eau distillée une deuxième fois ;
- Sécher en chaleur ;
- Examens à l'immersion.

Annexe N°2 :photos du matériel utilisé



Evaporateur rotatif.



Etuve.



Microscope optique



Centrifugeuse.

Résumé

L'*Opuntia ficus indica*, appelée habituellement "figuier de barbarie" est un cactus mexicain caractéristique des régions arides et semi arides; sa richesse en molécules bioactives rend sa valorisation médicale plus que nécessaire.

Ce travail a pour objectif d'estimer l'activité antibactérienne et antifongique de l'extrait polyphénoliques des jeunes cladodes d'*Opuntia Ficus indica* sur : *E. Coli* ATCC 25922. *B. Cereus* ATCC 10876. *B. Subtilus* ATCC 6633. *P.aerogenosa* ATCC27853. *S. Aureus* ATCC 33862. *Lactobacillus acidophilus*. *Aspergillus niger* ATCC 106404 et *Candida albicans* ATCC 10231.

L'extrait qui affiche un rendement d'extraction égale à $6,11 \pm 0,105$ % (m/m), est dosé en polyphénols et flavonoïdes, pour donner des taux de l'ordre de $40,18 \pm 0,9$ (mgEAG/g) et $4,09 \pm 1,12$ (mgEQ/g), respectivement.

L'évaluation de l'effet antimicrobien in vitro, est fait par deux méthodes de diffusion sur gélose; antibiogramme par disques et par puits. Les résultats valide un effet inhibiteur sur les deux souches bactériennes: *E. Coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas Aerogenosa* ATCC27853, et sur la levure *Candida albicans* ATCC 10231. Les autres microorganismes testés demeurent résistantes à l'extrait utilisé.

Mots clés : *Opuntia ficus indica*, valorisation thérapeutique, cladodes, Activité antimicrobienne, polyphénols, flavonoïdes, caractérisation.

ملخص

نبات الأوبونتيا المعروف عامة بالتين الشوكي هو صبار ذو أصل مكسيكي مميز للمناطق الجافة وشبه الجافة. غناه بالمركبات الفعالة بيولوجيا، يجعل من تثمينه طبييا امرا اكثر من مهم. تهدف هذه الدراسة الى تحديد القدرة المضادة للبكتيريا والفطريات للمستخلص عديد الفينولات المستخرج من فروع الأوبونتيا على الجراثيم التالية: *E. Coli* ATCC 25922. *B. Cereus* ATCC 10876. *B. Subtilus* ATCC 6633. *P.aerogenosa* ATCC27853. *S. Aureus* ATCC 33862. *Lactobacillus acidophilus*. *Aspergillus niger* ATCC 106404 . *Candida albicans* ATCC 10231).

لقد سجلنا اثناء عملية الاستخلاص مردودا قدره $6,11 \pm 0,105$ %، كما بينت نتائج التوصيف النباتي الكيمائي نسبا قدرها $40,18 \pm 0,9$ ملغ مكافئ حمض الغاليك/غ، و $4,09 \pm 1,12$ ملغ مكافئ الكارستين/غ، من عديد الفينولات والفلافونويدات تواليا. من جهة أخرى، فان قياس النشاط المضاد للبكتيريا والفطريات أظهر نتائج ايجابية ضد كل من *E. Coli* ATCC 25922 و *Pseudomonas Aerogenosa* ATCC27853، *Candida albicans* ATCC 10231. بالمقابل، فان بقية الجراثيم المدروسة ابانت عن مقاومة تجاه مستخلص فروع التين الشوكي المستعمل.

الكلمات الرئيسية: نبات الأوبونتيا، التثمين الطبي، فروع التين الشوكي، النشاط المضاد للجراثيم، عديدات الفينول، الفلافونويدات، التوصيف.