

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: "Microbiologie Appliquée"

Thème :

Evaluation de l'effet antibactérien des composés phénoliques issus de *Curcuma longa* L.

Présenté et soutenu publiquement par

-M^{elle} DERRICHE Amina

-M^{elle} ZERROUKI Fatima-zohra

-M^{elle} ZERROUKI Mokhtaria

Devant le Jury:

-Président: M . ACEM K.

-Promoteur: M^{me} BENGUIAR R.

-Co-promoteur : M^{me} BENARABA R.

-Examinatrice: M^{me} MEDJEBER N.

Année universitaire: 2017–2018

Remerciements

Tout d'abord nous remercions ALLAH le tout puissant de nous avoir aidés à finir cet humble travail de recherche.

*Nous souhaitons adresser nos remerciements les plus sincères à notre encadreur Melle **BENGUIAR Rachida** pour avoir accepté de diriger ce travail, qu'elle trouve ici, l'expression de nous profonde reconnaissance, nôtre immense gratitude et nous grand respect, pour tous ses efforts, son savoir, ses idées, ses encouragements.*

*Il ne nous serait pas possible de présenter ce mémoire sans témoigner de notre profonde gratitude à notre Co-promoteur Dr **BENARABA Rachida** pour son aide scientifique et de ses précieux conseils.*

*Nous sommes agréable de remercier Mr **ACEM** pour l'attention qu'il a bien voulu porter à ce travail en acceptant de présider le jury de soutenance de ce mémoire.*

*Nous sincères remerciements vont à Mme **MEDJEBER** d'avoir accepté d'être notre examinateur, et pour l'intérêt que vous porter sur notre travail.*

*Notre remerciement s'adresse à Mr **HOUCINE** le chef de spécialité de microbiologie appliquée.*

*Nous tenons à remercier vivement les membres de l'équipe de laboratoire en particulier Mme **BENABDELLAH Fatima** pour leur aide et encouragement.*

*Toutes nos salutations à Melle **AYAD Noura** et nos collègues de la promotion de Master II microbiologie appliquée pour leurs supports, leurs aides et leurs encouragements*

Dédicaces

Je dédie ce modeste mémoire

*A mes chers parents Benouda et Aicha qui m'ont éclairé le chemin
de la vie par leur grand soutien et leurs
encouragements, par leur énormes sacrifices, qu'ils m'ont consentis
durant mes études et qui ont toujours aimé me voire réussir.*

Que Dieu les gardes et les protèges

A mes chères frères Farid Rabah et Abdelkader

A mes adorables sœurs Habiba et Nadjet

qui mon toujours soutenus et toujours étaient présentés avec moi.

A tous mes très chères amies,

Kheira², Widad, Atika, Hayet, Amina,

Salima, Nawal, Sara, Nacira, Rabiaa,

Khadidja

pour leurs aides et leurs amitiés

A tous ceux que j'aime.

A Tous ceux qui m'ont connus, encouragés,

Aidés du près ou du loin pendant tous mon cursus.

Fatima zohra



Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

A mes chers parents Mebarĳa et Mnaour, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse et leur prière tout au long de mes études.

A mes adorables sœurs Fatima et Chaimaa pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral

A mes chers frères Khaled , Abdelĳader, Saad , Madani , mon oncle Mohamed pou leur appui et leur encouragement.

A ma grande mère et mon grand père Djelol et Fatma Pour leur prière.

A tous ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours Universitaire.

A tous mes très chères amies, Atiĳa , Amina, Aicha , Fatima, Hayet, Horia, Khadidja, Kheira, Nacira, Nawel,

Rabia, Sara, Salima

pour leurs soutiens et leurs bénédictions

A toute personne ayant contribué de près ou De loin à la réalisation de ce travail

Mokhtaria



Dédicaces

*Je dédie se modeste travail premièrement à mes très chères
Parents Habib et Meriem, pour leurs soutien, sacrifices, et
Tous les efforts consentis À mon éducation, À mes frères Houari
et Miloud, et mes chères sœurs Khaldia, Kheira, Kaltoum, Nawel,
Hamida, pour leurs amours et soutien moral .*

*À mon fiancie Abdelmadjid, pour leur
Encouragement, À tous les Membres de ma famille
À mes très chères amies Fatima Zahra ,Mokhtaria, Kheira,
Hadjer, Atika, widad, Ghezala , Hayate ,Amina,Salima
,Nawel ,Nacira; pour les bons moment qu'on a passe ensembles merci
pour Leurs soutiens morals et encouragements.*

*À tous la promotion de microbiologie appliquée
(2017/2018) et tout qui me connaisse de près ou de loin*

Amina



Liste des abréviations	i
Liste des figures	ii
Liste des tableaux	iii
Liste des annexes	iv

Sommaire

Introduction

I : Synthèse bibliographique

I. Présentation de <i>Curcuma longa</i> L.	2
I.1. Historique	2
I.2. Description botanique de <i>Curcuma longa</i>	2
I.3. Composition chimique et métabolites secondaires de <i>Curcuma longa</i> L.	3
I.4. Activités biologiques et thérapeutique de <i>Curcuma longa</i> L.	4
I.4.1. Activité antimicrobienne	4
I.4.2. Activité antioxydante	5
I.4.3. Activité anti-inflammatoire	5
I.4.4. Activité anticancéreuse	5

II : Matériel et Méthodes

II.1. Objectifs	6
II.2. Lieu et durée de travail	6
II.3. Matériel et produits chimiques.....	6
II.4. Matrice végétale	8

II.5. Matériel biologique.....	8
II.6. Etude expérimentale	8
II.6.1. Préparation des différents extraits phénoliques à partir des rhizomes de <i>Curcuma</i>	10
II.6.1.1. Rendement d'extraction.....	11
II.6.1.2. Dosage des composés phénoliques totaux extractibles	11
II.6.1.3. Dosage des flavonoïdes	13
II.6.2. Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits méthanolique et éthanolique de <i>Curcuma longa</i> L.....	14
II.6.2.1. Préparation des pré-cultures.....	14
II.6.2.2. Ré-identification des souches	14
II.6.2.2.1. Coloration de Gram	14
II.6.2.2.2. Test de catalase	14
II.6.2. 2.3. Test d'oxydase	15
II.6.2.3. Effet des extraits phénoliques de <i>Curcuma longa</i> L. sur des souches pathogènes	15
II.6.2.3.1.Méthode de diffusion en milieu gélosé	15
II.6.2.3.2. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) des extraits méthanolique et éthanolique de <i>Curcuma longa</i> L. par la méthode de microdilution	16

III : Résultats et Discussions

III.1. Extraction et quantification des composés phénoliques.....	18
III.1.1. Rendements d'extraction	18
III.1.2. Quantification des composés phénoliques totaux et des flavonoïdes	19
III.2. Activité antibactérienne.....	21
III.2.1. Ré-identification des souches bactériennes étudiées (<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 10876, <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 et <i>Escherichia coli</i> ATCC 10536)	21
III.2.2. Caractères morphologiques des souches étudiées	21

III.2.3. Caractères biochimiques.....	21
III.2.4. Sensibilité des souches bactériennes étudiées (<i>E.coli</i> , <i>B.subtilis</i> , et <i>S.aureus</i>) vis-à-vis des extraits méthanolique et éthanolique de <i>Curcuma longa</i> L.....	22
III.2.4.1. Effet antibactérien des extraits méthanolique et éthanolique par la méthode de diffusion sur gélose	22
III.2.4.2. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) des extraits méthanolique et éthanolique de <i>Curcuma longa</i> L. par la méthode de microdilution	25

Conclusion

Références Bibliographiques

Annexes

Résumé

Liste des abréviations

AG :	Acide gallique
ALCL₃:	Trichlorure d'aluminium
ATCC :	American Type Culture Collection
<i>B.subtilis</i> :	<i>Bacillus subtilis</i>
CMB:	Concentration Minimale Bactéricide
CMI :	Concentration Minimale Inhibitrice
DMSO:	Diméthylsulfoxyde
<i>E. coli</i>:	<i>Escherichia coli</i>
EAC :	Extrait aqueux de <i>Curcuma longa</i> L.
EAG :	Equivalent Acide Gallique
EEC :	Extrait éthanolique de <i>Curcuma longa</i> L.
EMC:	Extrait méthanolique de <i>Curcuma longa</i> L.
EN :	Equivalent Naringinine
EQ :	Equivalent de Quercétine
ES :	Erreur Standard
H₂O₂ :	Peroxyde d'hydrogène
MH :	Milieu Muller Hinton
RFC:	Réactif de Folin Ciocalteu
<i>S .aureus</i> :	<i>Staphylococcus aureus</i>

Liste des figures

Figure N° 01 : Plante <i>Curcuma longa</i> L.....	3
Figure N°02 : Structure chimiques des molécules bioactif de <i>C.longa</i>	4
Figure N°03 : Organigramme récapitulatif de la démarche	10
Figure N°04 : Rendements d'extraction des composés phénoliques des rhizomes de <i>Curcuma longa</i> L., pour les trois solvants	20
Figure N°05 : Teneurs en composés phénoliques de l'extrait méthanolique, éthanolique et aqueux de <i>Curcuma longa</i> L	21
Figure N°06 : Teneurs en flavonoïdes de l'extrait méthanolique, éthanolique et aqueux de <i>Curcuma longa</i> L.....	21
Figure N°07 : Aspects microscopiques d' <i>E.coli</i> (A), <i>S .aureus</i> (B) et <i>B. subtilis</i> (C)	24
Figure N°08 : CMI et CMB d'extrait éthanolique de <i>C.longa</i> vis à vis <i>S.aureus</i> , <i>B.subtilis</i> et <i>E.coli</i>	28
Figure N°09 : CMI et CMB d'extrait méthanolique de <i>C.longa</i> vis à vis <i>S.aureus</i> , <i>B.subtilis</i> et <i>E.coli</i>	28

Liste des tableaux

Tableau N°01 : Matériel et produits chimiques utilisés	8
Tableau N°02 : Diamètres des zones d'inhibition induits par les antibiotiques et les extraits de <i>Curcuma longa</i> L	26

Liste des annexes

Annexe I : Composition des milieux de cultures utilisés.

Annexe II : Coloration de Gram.

Annexe III : Courbes d'étalonnage de l'Acide gallique et de la Quercétine.

Annexe IV : Effets des antibiotiques et de DMSO sur les souches testés.

Introduction

La prolifération de bactéries résistantes est devenue une préoccupation majeure dans le domaine de la santé. En devenant insensibles à tout traitement, ces bactéries limitent la gamme d'antibiotiques disponibles en thérapeutique médicale. La situation est d'autant plus alarmante que les infections causées par les bactéries résistantes entraînent souvent une prolongation de l'état pathologique et une augmentation du taux de mortalité. L'acquisition de ces multiples résistances a engendré une perte d'efficacité de l'antibiothérapie pour conduire à une impasse thérapeutique. En effet, les extraits de plantes commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentiel de molécules naturelles bioactives. Parmi ces substances à prendre en compte, les composés phénoliques occupent une place de choix. En effet, ces dernières de par leur activité antioxydante et antimicrobienne puissante, suscitent de plus en plus l'intérêt des chercheurs.

Récemment l'activité périodique de ces composés a été largement décrite. Ces molécules sont réputées d'avoir aussi des propriétés antivirales, anti-inflammatoires et anticancéreuses, ils font l'objet d'étude pour leur éventuelle utilisation comme une solution alternative pour le traitement des maladies infectieuses et pour la conservation des aliments.

Le *Curcuma* (*Curcuma longa* L.) fait partie de plantes riches en polyphénols (**Soni Himesh et al., 2011**). Ce dernier, est une plante vivace appartenant à la famille des *Zingiberaceae* (**Kodjio et al., 2016**). Le rhizome réduit en poudre est utilisé en tant qu'épice alimentaire pour renforcer la saveur des aliments et les conserver. Il a été bien établi que le *Curcuma* possède une large gamme d'activités biologiques y compris l'inhibition de la croissance microbienne, la réduction de la peroxydation des lipides (**Araújo et al ., 2001**). Ainsi, il inhibe certain nombre de différentes molécules qui jouent un rôle important dans l'inflammation (**Akram et al ., 2010**).

Depuis ces dix dernières années, le nombre d'études sur le curcuma et surtout sur son constituant majeur, la curcumine, n'a cessé d'augmenter afin de comprendre ses mécanismes d'actions et dans l'espoir de traiter de nombreuses maladies. Dans cette optique, l'objectif de cette étude s'intéresse à extraire les composés phénoliques de curcuma en utilisant la méthode de macération (avec différents solvants) afin d'évaluer *in vitro* son activité antibactérienne vis-à-vis des bactéries pathogènes.

Sommaire

*Synthèse
bibliographique*

I. Présentation de *Curcuma longa* L.

I.1. Historique

Le terme « *Curcuma* » vient de l'espagnol qui l'a lui-même emprunté à l'arabe kurkum, lequel désignait originellement le safran. Le nom anglais de cette plante *turmeric* provient du Latin Médiéval (*terramerrita*) qui devenu en Français Terre méritée (**Ravindran et al., 2007**). Le *Curcuma* est une épice qui fait l'objet d'échanges commerciaux depuis longtemps que ne peut déterminer avec certitude son centre d'origine. Depuis 6000 ans le curcuma est connu comme l'épice magique dans la médecine traditionnelle Indienne du fait leurs utilisations dans le traitement de la jaunisse et la lèpre. Le pays d'origine de cette plante n'est pas clairement identifié mais la plus grande diversité se trouve en Inde et en Thaïlande, avec au moins 40 espèces dans chacune, suivie par le Bangladesh, l'Indonésie et le Vietnam (**Leong-Škorničková et al., 2008**).

I.2. Description botanique de *Curcuma longa*

Le *Curcuma longa* L. fait parties des espèces médicinales. C'est une plante herbacée vivace rhizomateuse de la famille des Zingiberaceae appartenant à la classe des monocotylédones (**Agric, 2008**). Qui peut mesurer de 0,50 à 1 m de hauteur (**Orliac, 2002**). Le rhizome principale est tuberculeux, écaillé et porte de nombreuses racines qui se terminent par des renflements tubéreux elliptique, les rhizomes secondaires étant plutôt digités; ces rhizomes présentent des cicatrices circulaires qui correspondent à l'endroit d'insertion des tiges feuillées desséchées (**Teuscher et al., 2005**). Ses feuilles sont très longues, alterne et distique, possèdent une puissante nervure axiale et des nervures secondaires parallèles, les fleurs ont une couleur blanc jaunâtre et quelque fois bordée de violet avec un calice tubulaire et un corolle tubulaire à sa base, avec 3 lobes inégaux, blancs et courts, la partie supérieure beaucoup plus large elle contient un ovaire infère à trois loges, avec 2 glandes érigées, surmonté d'un style mince, passant entre les thèques de l'anthere et soutenu par celles-ci, avec un stigmate élargi (**Borget, 1970**), comme représenté dans la **Figure N°01**.

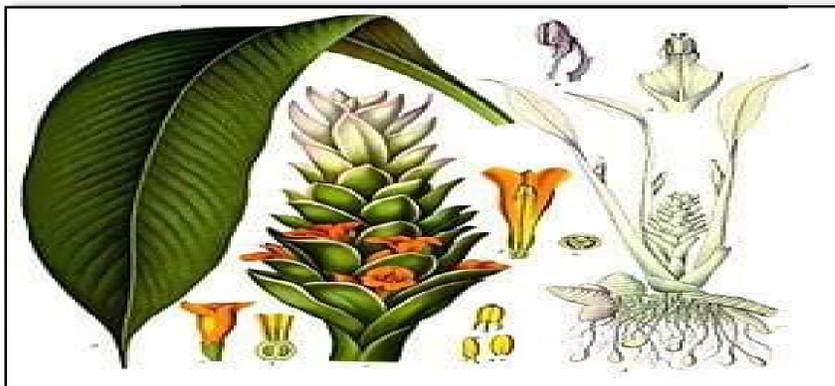


Figure N°01: Plante *Curcuma longa* L. d'après Jourdan, (2017)

I.3. Composition chimique et métabolites secondaires de *Curcuma longa* L.

Le *Curcuma* est composé de 3-7% d'eau, de 6-8% de protéine et 2-7% de fibres alimentaire. Il contient aussi des minéraux, dont le calcium, magnésium, phosphore et le fer (Nelson et al., 2017). Sa particularité réside en sa richesse en composés phénoliques connus sous le nom «Curcuminoïdes». Celui-ci est majoritairement composée de 52-63 % curcumine I (diféruoyl méthane [1,7-bis-(4-hydroxy-3-méthoxy-phényl hepta-1,6-diene-3,5-dione)], de 19-27% curcumine II (Déméthoxycurcumine [4-hydroxy cinnamoyl-(4-hydroxy-3-méthoxy cinnamoyl) méthane]) et 18-28% de curcumine III Bisdéméthoxycurcumine [bis-(4-hydroxy cinnamoyl) méthane](Ravindranet al., 2007). **Figure N°02.**

Il contient aussi un flavonoïde actif dit diferuloylméthane, mais la curcumine est le constituant majeur le plus étudiés (Akram et al., 2010), en plus le curcuma contient aussi des monoterpènes monocycliques, des sesquiterpènes (bisabolanes et germacrane), de l'ar-turmerone et des huiles essentielles (Agric, 2008). Cette composition lui a attribué plusieurs propriétés dans le domaine médical et agroalimentaire.

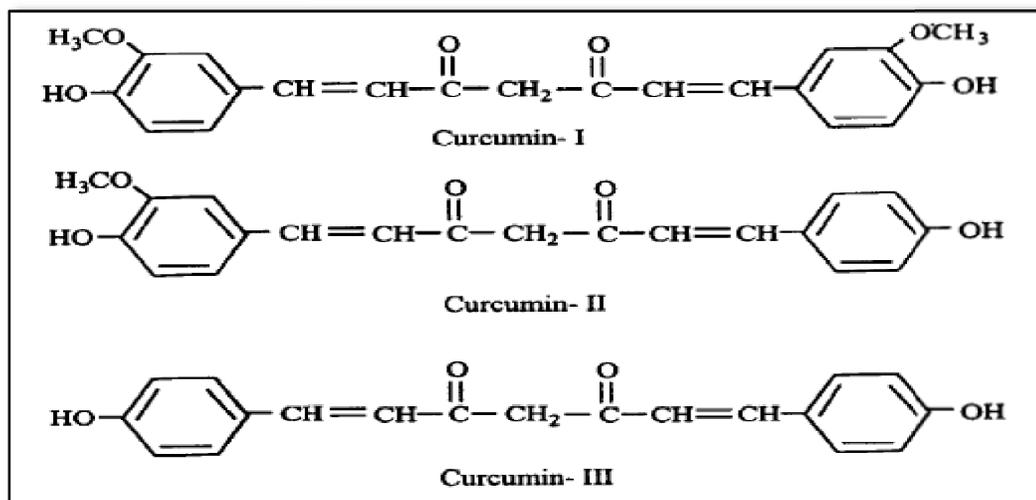


Figure N°02 : Structures chimiques des molécules bioactives de *C. longa* d'après **Chattopadhyay et al., (2004)**

I.4. Activités biologiques et thérapeutique de *Curcuma longa* L.

De nombreuses propriétés thérapeutiques de curcuma ont été démontrées par plusieurs auteurs. On peut dénombrer un effet antioxydant et anti-inflammatoire (**Rarnsewak et al., 2000**), un effet anticancérogène (**Priyadarsini ,2014**) et un effet antimicrobien (**Rachana et al., 2015**).

I.4.1. Activité antimicrobienne

Plusieurs études scientifiques ont démontré que le curcuma a divers effets pharmacologiques incluant des activités antivirales (**Sahne et al.,2016**). En effet, des extraits éthanoliques de curcuma ont été examinés contre différentes espèces bactériennes (*Staphylococcus epidermidis* et *Hylicobacter pylori*) et fongique (*Aspergillus niger*, *Fusarium moniliforme*)(**Ravindran et al., 2007**).

I.4.2. Activité antioxydante

Les antioxydants sont des molécules qui contribuent à la protection de notre corps contre des substances potentiellement dangereuses que l'on appelle radicaux libres. En effet, l'activité antioxydante de curcuma est due par son principale composant qui est la curcumine, ce dernier exerce une forte activité antioxydante plus puissante que celle de la vitamine C, E et β -carotène (Akram et al., 2010). Une étude a démontré que les Curcuminoïdes ont la capacité de piéger ou neutraliser les radicaux libres DPPH (1,1 diphényl-2-picrylhydrazyle) d'une manière dose-dépendant, ainsi que la curcumine possède une excellente propriété antioxydante dans la peroxydation lipidique que l'alpha-tocophérol (Ravindran et al., 2007).

I.4.3. Activité anti-inflammatoire

De nombreuses études affirment l'activité des extraits de curcuma. en tant qu'inhibiteurs puissants de l'inflammation (Araújo et al., 2001). Des travaux expérimentaux dévoilent que la curcumine intervient dans la réponse inflammatoire en inhibant des différentes molécules impliquant dans l'inflammation, y compris phospholipase, lipooxygénase, COX-2, les leucotriènes, thromboxane, les prostaglandines, l'oxyde nitrique, l'élastine, la hyaluronidase, MCP-1, le facteur de nécrose tumorale, et l'interleukine-12 (Chainani-wu, 2003).

I.4.4. Activité anticancéreuse

Plusieurs recherches ont été menées sur le potentiel anticancéreux du curcuma contre diverses formes de cancer, notamment les cancers colorectal, prostatique, buccal, sanguin et du sein, il est également démontré que le curcuma était le plus efficace contre différentes lignées cellulaires de cancer de la prostate, ainsi que leurs extraits étaient efficace pour induire l'apoptose dans les cellules de la leucémie myéloïde humaine (HL-60) (Ravindran et al., 2007).

D'autres études *in vivo* affirment la capacité de la curcumine dans l'inhibition de la carcinogénèse à trois étapes: la promotion tumorale, l'angiogénèse et la croissance tumorale (Akram et al., 2010).

Matériel et Méthodes

II.1.Objectifs

Cette présente étude s'intéresse à extraire les composés phénoliques issus de *Curcuma longa* L. et déterminer leur quantités, ainsi d'évaluer *in vitro* l'activité antibactérienne des extraits phénoliques (méthanolique et éthanolique) de *C.longa* vis-à-vis trois souches *Staphylococcus aureus* ATCC 10876, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 et *Escherichia coli* ATCC 10536.

II.2. Lieu et durée de travail

La démarche expérimentale concernant cette étude a été réalisée sur une période allant du 24 Janvier au 30 Avril 2018, elle a eu lieu au sein des laboratoires suivants :

- Laboratoire d'Amélioration et Valorisation des Productions Animales Locales Université Ibn Khaldoun-Tiaret.
- Laboratoire de Microbiologie, de Biochimie, et d'Amélioration des plantes de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie Université Ibn Khaldoun –Tiaret.

II.3. Matériel et produits chimiques

Les verreries, l'appareillage et les milieux de culture ainsi que les solvants utilisés au cours de la réalisation de ce travail sont résumés dans le **tableau N° 01**.

Matériel et Méthodes

Tableau N°01 : Matériel et produits chimiques utilisés

Matériel, verrerie et appareillage	Solvants et réactifs	Milieux de culture
<ul style="list-style-type: none"> -Autoclave (sanoclave) -Agitateur magnétique thermique (Stuart) -Balance de précision (Sartorius) -Broyeur -Etuve(Memmert) -Spectrophotomètre a double faisceau lumineux (Shimadzu). -Cuves spectrophotométriques -Micropipette - Vortex -Ecouillons stériles -Microscope optique (Optika) -Microplaques - Bêchers - Boîtes de Pétri - Entonnoirs -Embouts stériles - Erlenmeyers - Fiole jaugées - Eprouvettes graduées - Tubes à essai - Pipettes Pasteur - Verre a montre - Lames 	<ul style="list-style-type: none"> - Méthanol pur (98,9%) -Ethanol pur (99,9%) - DMSO <i>pur à</i> (99.5%) -Carbonate de sodium (Na_2CO_3 ; PM=106g/mol) -Trichlorure d'aluminium (AlCl_3 ;PM=133,34g/mol) - Chlorure de triphényltétrazolium (TTC) -Disques d'antibiotiques -Tétracycline(TE^{30}) -Ceftazidime(CAZ^{30}) -Eau distillée -Eau physiologique (0.9%) -Eau oxygénée(H_2O_2) - Acide gallique ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$ PM=170,12g/mol) - Réactif de Folin Ciocalteu -Lugol -Fuchsine - Violet de Gentiane -Méthanol pur à (98,9%) -Quercétine ($\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_7$; PM=302,236g/mol) 	<ul style="list-style-type: none"> - Milieu de Mueller Hinton - Milieu Mac Conkey -Milieu de Chapman -Gélose nutritive

II.4. Matrice végétale

Elle est constituée des rhizomes de curcuma, cette plante est généralement connue par ses propriétés médicinales dues à sa richesse en composants bioactifs, ces rhizomes ont été procuré par voie commerciale chez un herboriste de la wilaya de Tiaret en Janvier 2018.

II.5. Matériel biologique

Les souches utilisées pour évaluer l'activité antibactérienne sont des souches de Collection Internationale ATCC (American Type Culture Collection). Il s'agit d'*Escherichia coli* ATCC 10536, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 et *Staphylococcus aureus* ATCC 10876.

Ces souches ont été fournies gracieusement par l'Unité de Microbiologie du Groupe SAIDAL de Média.

II.6. Etude expérimentale

Notre présent travail est scindé en deux parties;

- 1- Extraction des composés phénoliques de curcuma et leur quantification.
- 2- Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits (méthanolique et éthanolique), vis à vis trois bactéries *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*.

La démarche expérimentale globale concernant cette étude est illustrée par l'organigramme suivant :

Matériel et Méthodes

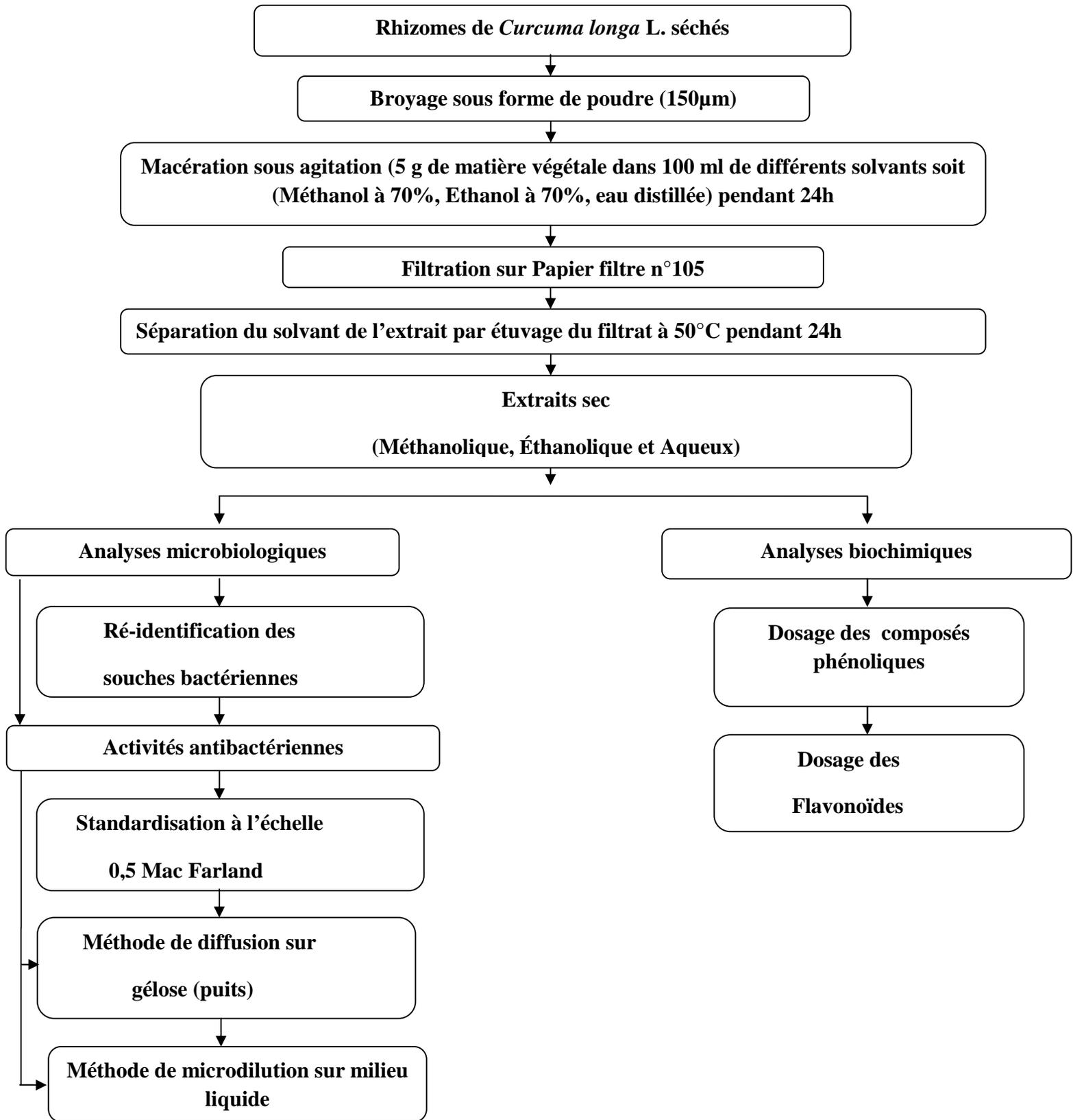


Figure N°3 : Organigramme récapitulatif de la démarche expérimentale.

II.6.1. Préparation des différents extraits phénoliques à partir des rhizomes de *Curcuma*

Différents types d'extraits ont été préparés à partir de curcuma. Les rhizomes de curcuma ont été séchés dans une étuve à température de 50 C° pendant trois jours puis broyés à l'aide d'un broyeur mécanique, l'extraction a été effectuée par le biais de la technique de macération (Nurcholis et al., 2017), trois solvants ont été utilisés: Le méthanol 70%, l'éthanol 70% et l'eau distillé, et ce afin de définir le meilleur solvant optimisant le rendement d'extraction.

- **Principe**

Le principe consiste à ce que le solvant doit franchir la barrière de l'interface solide/liquide, dissoudre le composé actif à l'intérieur du solide et l'entraîner à l'extérieur. Plusieurs auteurs suggèrent que l'entrée du solvant se fait par un mécanisme osmotique et la sortie du soluté se fait par dialyse ou par diffusion (Alupupui et al.,2009).

- **Extraction organique**

5g de poudre de rhizome de curcuma a été macéré dans 100 ml de solvant (le Méthanol à 70% ou l'éthanol à 70%) après une agitation de 24h à température ambiante et à l'abri de la lumière, une filtration a été faite sur un papier filtre n°105 afin d'éliminer les débris cellulaires, le filtrat obtenus a été débarrassé de son solvant par évaporation à 50C° et ce afin d'obtenir des extraits secs. leur solubilisation a été réalisée dans Diméthylsulfoxyde (DMSO) à raison de 100mg/ml (Tanvir et al., 2017).

- **Macération aqueuse**

Une macération aqueuse a été effectuée sur 5g de poudre de curcuma avec 100 ml d'eau distillée, une agitation a été faite pendant 24h à température ambiante, Après une filtration à l'aide d'un papier filtre n°105 ensuite l'eau contenue dans le filtrat a été éliminée par évaporation dans étuve à 50°C (Tanvir et al., 2017).

II.6.1.1. Rendement d'extraction

Le poids de l'extrait sec (**PF**) a été calculé par la différence entre le poids de la boîte de Pétri en verre plein (après élimination du solvant) et le poids de la boîte de Pétri en verre vide, sur le poids de la poudre utilisée. Le rendement de l'extraction est exprimé en pourcentage. Il est calculé par la formule suivante :

$$R\% = (PF - PI / Pp) \times 100$$

Où :

R: le rendement en pourcentage(%);

PF: le poids de la boîte de Pétri en verre plein (extrait sec);

PI: le poids de la boîte de Pétri en verre vide;

Pp: le poids de la poudre mise à l'extraction.

II.6.1.2. Dosage des composés phénoliques totaux extractibles

▪ Principe

Le dosage des composés phénoliques totaux dans les extraits de curcuma. a été effectué spectrophotométriquement selon la méthode au réactif de Folin Ciocalteu décrite par **Singleton et al., (1999)**. Ce réactif, constitué par un mélange d'acide phosphotungstène ($H_3PW_{12}O_{40}$) et phosphomolybdène ($H_3PMO_{12}O_{40}$) de couleur jaune, il est réduit lors de l'oxydation des phénols, en mélange d'oxydes de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (MO_8O_{23}). La coloration bleu produite est proportionnelle à la teneur en phénols totaux et possède une absorption maximale aux environs de 760 nm (**Bonnaillie et al., 2012**), dont l'intensité est proportionnelle à la quantité des composés phénoliques présents dans l'échantillon, le dosage des composés phénoliques a été effectué par la comparaison de la densité optique observée à celle obtenue par un étalon d'acide gallique de concentration connue.

▪ Technique

0,25 ml de chaque extrait dilué a été ajouté à 0,25ml de réactif de Folin-Ciocalteu (0,2N) 10 fois dilué dans l'eau distillée. La solution a été mélangée par un vortex et incubée pendant 2 min, Après l'incubation 0,5 ml de solution de Carbonate de sodium Na_2CO_3 (75mg/ml dans l'eau distillée) ont été additionné. Le mélange ainsi obtenu a été incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant vingt minutes, L'absorbance du mélange a été ensuite mesurée à $\lambda = 760$ nm par un spectrophotomètre (**Mahmoudi et al., 2013**) contre un blanc sans extrait ce qui nous a permis de tracer la courbe d'étalonnage, ainsi que la teneur des polyphénols totaux est calculée à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique. Cette courbe a été établie avec des concentrations précises d'acide gallique (**1 mg/ml ; 0,5mg/ml; 0,25mg/ml; 0,125mg/ml; 0,0625mg/ml; 0,0312mg/ml; 0,0156mg/ml ; 0,0078mg/ml; 0,0039mg/ml; 0,0019 mg/ml**) utilisée comme standard de référence. Ce standard a subi les mêmes conditions expérimentales que l'échantillon. La teneur des composés phénoliques est exprimée en milligramme Equivalent Acide Gallique (EAG) par gramme de matière sèche (mg EAG/g Ms), le calcul de cette teneur a été effectué selon la formule suivante :

$$C = (c \times D \times V) / m$$

C : Teneur en polyphénols totaux exprimée en mg Equivalent Acide Gallique par g de matière sèche (mg EAG/g Ms) ;

c: concentration de l'échantillon lue ;

D: facteur de dilution;

V: volume utilisé pour l'extraction en ml ;

m: masse de l'échantillon exprimée en g.

II.6.1.3. Dosage des flavonoïdes

La quantification des flavonoïdes totaux contenus dans les différents extraits de curcuma est réalisée par la méthode de **Bahorun et al., (1996)**.

▪ Principe

Le principe de cette méthode est basé sur la formation de complexes de couleur jaune entre les composés phénoliques et trichlorure d'aluminium (AlCl_3). Ceci traduit le fait que le métal perd deux électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygène de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons. La couleur jaune présente une absorption maximale à 430 nm.

▪ Technique

Un ml de la solution d'extrait a été ajouté à 1ml d' AlCl_3 à 2% préparé dans le méthanol pur, Le mélange a été vigoureusement agité et l'absorbance a été lue après 10min d'incubation à une longueur d'onde de 430 nm en utilisant un spectrophotomètre. La quantification des flavonoïdes se fait en fonction d'une courbe d'étalonnage, réalisée avec un flavonoïde de référence; la Quercétine. La teneur en flavonoïdes est exprimée en microgramme équivalent de Quercétine par gramme de matière sèche ($\mu\text{g EQ/g Ms}$). Le calcul de cette teneur a été effectué selon la formule suivante :

$$C = (c \times D \times V)/m$$

Où ;

C: Teneur en flavonoïdes exprimée en μg Equivalent Quercétine par g de matière sèche ($\mu\text{g EQ/g Ms}$);

c: concentration de l'échantillon lue ;

D: facteur de dilution;

V: volume utilisé pour l'extraction en ml;

m: masse de l'échantillon exprimée en g.

II.6.2. Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits méthanolique et éthanolique de *Curcuma longa* L.

II.6.2.1. Préparation des pré-cultures

A partir des géloses de Mac Conkey, Chapman et Gélose nutritive, un prélèvement des souches *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* a été réalisé à l'aide d'une anse de platine puis ensemercer en stries serrés dans un milieu solide correspondant à chaque souche ;

Mac Conkey pour *Escherichia coli*, gélose nutritive pour *Bacillus subtilis* et la gélose Chapman pour *Staphylococcus aureus*. Ces ensemencements ont été suivis d'une incubation de 18h à 37°C et ce afin d'obtenir des cultures jeunes.

II.6.2.2. Ré-identification des souches

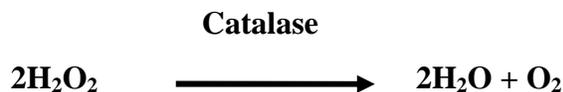
II.6.2.2.1. Coloration de Gram

La coloration de Gram est une technique qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne (**Philippe, 2009**). Pour la détermination de ces propriétés un frottis bactérien a été préparé à partir de chaque souche puis coloré par la coloration de Gram (**voir annexe II**) et examiné sous microscope au grossissement ($\times 100$).

II.6.2.2.2. Test de catalase

- **Principe**

D'après **Larpent (1997)**, le test de catalase sert à démontrer si la bactérie possède l'enzyme servant à décomposer le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et en oxygène comme suit :



- **Technique**

A l'aide de l'effilure d'une pipette Pasteur. Un fragment de colonie a été dissocié dans l'eau oxygénée, une goutte d'eau oxygénée a été déposée antérieurement sur une lame propre. Le dégagement des bulles de gaz indique la présence de la catalase: donc le test de catalase est dit positif.

II.6.2.2.3. Test d'oxydase

- **Principe**

L'oxydase ou cytochrome oxydase est une enzyme présente dans certaines chaînes respiratoires cytochromiques (**Delarras, 2007**)

- **Technique**

Cette technique consiste à déposer un disque « Ox » sur une lame et l'imbiber avec une goutte d'eau distillée, puis une parcelle de la colonie a été prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée stérile ensuite elle a été étalée sur le disque. Un résultat positif se manifeste par une coloration violette foncée qui apparaît sur ce disque.

II.6.2.3. Effet des extraits phénoliques de *Curcuma longa* L. sur des souches pathogènes

Deux méthodes ont été effectuées pour évaluer l'activité antibactérienne des extraits méthanolique et éthanolique issus de *Curcuma longa* L., on note : la méthode de diffusion sur gélose et la méthode de microdilution en milieu liquide.

II.6.2.3.1. Méthode de diffusion en milieu gélosé

- **Principe**

Cette méthode a été proposée par **Cooper** et **Woodman** en **1946** puis reprise par **Shroder** et **Messing** en **1949**, elle mesure une diffusion radiale de l'extrait à partir d'un puit en donnant une zone d'inhibition claire et facilement mesurable.

▪ Technique

A partir d'une culture jeune de 18 h d'incubation, une suspension bactérienne a été réalisée dans l'eau physiologique stérile et ce pour chaque souche. La turbidité de cette suspension a été ajustée à 0,5 Mac Farland, puis diluée au 1/100. On obtient alors un inoculum estimé à 10^6 cellule/ml. Par la suite, cet inoculum a été ensemencé à l'aide d'un écouvillon par la technique des stries sur toute la surface des boîtes de Pétri contenant la gélose Mueller-Hinton. Les boîtes de Pétri ainsi ensemencées ont été laissées sécher à l'air libre pendant 15 minutes ensuite des puits ayant un diamètre de 6 mm ont été créés au sein de cette gélose, ces derniers ont été remplis de 50µl des deux extraits (extrait méthanolique ou éthanolique).

L'extrait se diffuse de manière uniforme et après 24 h d'incubation, la présence autour des puits d'une zone d'inhibition circulaire dans laquelle il n'y a pas de croissance de bactéries dénote la sensibilité de ceux-ci à cet extrait. Plus la zone d'inhibition est grande, plus la bactérie est sensible. Le screening antibactérien a été effectué avec trois concentrations pour chaque extrait, on note : 100mg/ml ; 50mg/ml; 25mg/ml. Parallèlement des boîtes dites témoins négatifs dans lesquelles les puits ont été remplis de 50 µl DMSO pur et d'autres dites témoins positifs avec des disques d'antibiotiques à savoir, **Ceftazidime (CAZ³⁰)**, et **Tétracycline (TE³⁰)**, voir **annexe N°IV**. La lecture des boîtes a été faite après 24h d'incubation à une température de 37C°.

II.6.2.3.2. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) des extraits méthanolique et éthanolique de *Curcuma longa* L. par la méthode de microdilution

▪ Principe

Cette technique consiste à inoculer, par un inoculum standardisé, une gamme de concentration décroissante en extrait. Après incubation, l'observation de la gamme permet d'accéder à la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI), qui correspond à la plus faible concentration en extrait capable d'inhiber la croissance bactérienne comme recommandé par le **Comité National des Normes des Laboratoires Cliniques(1997)**.

Matériel et Méthodes

▪ Technique

25mg/ml des extraits éthanolique ou méthanolique sont préparés et dilués dans un bouillon Mueller Hinton à des concentrations décroissantes (12,5 mg/ml ; 6,25 mg/ml ; 3,12 mg/ml ; 1,56 mg/ml; 0,78 mg/ml ; 0,39 mg/ml). Ensuite 100µl de chaque concentration générée , ont été déposés dans les puits d'une microplaque à 96 puits (**Klančnik et al., 2010**) ,les puits ainsi préparés ont été inoculés par 10^6 cellule/ml de chaque suspension bactérienne à étudier (*S.aureus*, *d'E.coli* et *B.subtilis*). Sur la même microplaque les puits de la dernière ligne ont été additionnés de bouillon Muller Hinton seul afin de servir de témoin négatif, alors que les puits de la première ligne de la même microplaque ont reçu le milieu Mueller Hinton inoculé par la même concentration des bactéries citées précédemment et sans extrait (témoin positif).

Les microplaques ainsi préparées ont été incubées 18 heures à 37°C. A la fin de cette incubation la croissance bactérienne a été visualisée en ajoutant 20 µl d'un révélateur de croissance : Chlorure de triphényltétrazolium (TTC). La CMI a été déduite à partir du premier puits de concentration dépourvue de croissance bactérienne.

Résultats et Discussions

III.1. Extraction et quantification des composés phénoliques

III.1.1. Rendements d'extraction

Les rendements obtenus après extraction des composés phénoliques de *Curcuma longa* L. en utilisant les trois solvants (Ethanol, Méthanol et Eau) sont indiqués dans la **figure N°04**.

Le calcul des rendements par rapport au poids total de broyat montre que l'extrait éthanolique issu de curcuma présente un rendement plus élevé évalué à **12,36%** suivi par l'extrait méthanolique à raison de **11,21%**, et finalement l'extrait aqueux avec un faible rendement de **6,24%**.

Cette variation dans les rendements dépend du type de solvant, il est bien établi qu'il existe une affinité entre le solvant d'extraction et les composés d'extraits, ainsi que son activité biologique (**Ghasemzadeh et al., 2011**). Toutefois, il est difficile de comparer nos résultats avec ceux de la littérature, le rendement n'est que relatif et ne dépend que les conditions expérimentales dans lesquelles l'extraction a été effectuée, et les solvants utilisés, influencent le contenu total en phénols.

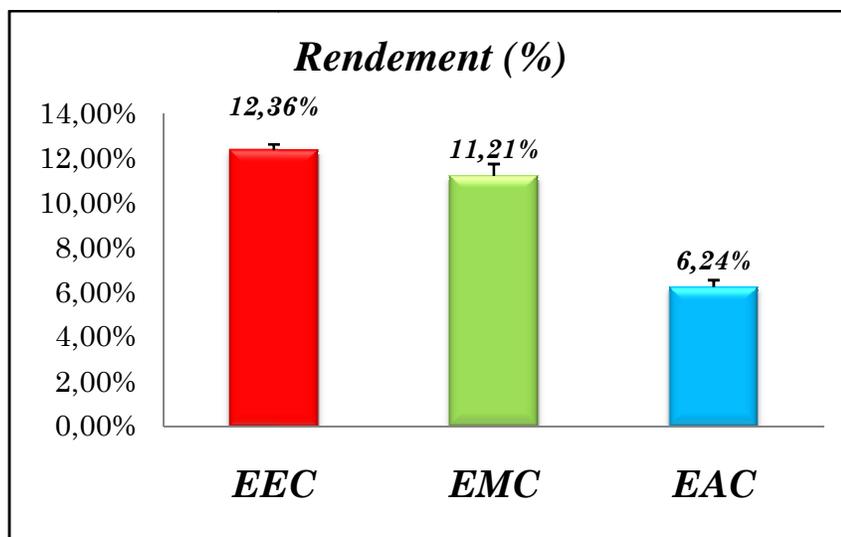


Figure N°4 : Rendements d'extraction des composés phénoliques de *Curcuma longa* L., pour les trois solvants. (Les valeurs représentées correspondent à la moyenne \pm ES, de trois essais indépendants).

EMC : Extrait Méthanolique de curcuma.

EEC : Extrait Ethanolique de curcuma.

EAC : Extrait Aqueux de curcuma.

III.1.2. Quantification des composés phénoliques totaux et des flavonoïdes

L'analyse quantitative des teneurs en composés phénoliques et des teneurs en flavonoïdes des extraits cités précédemment (éthanolique et méthanolique) sont déterminées graphiquement à partir des équations de la régression linéaire de chaque courbe d'étalonnage exprimée respectivement en mg EAG/g Ms et en mg EQ/g Ms, Les résultats obtenus de cette analyse sont représentés dans les **Figures N°05** et **N°06**.

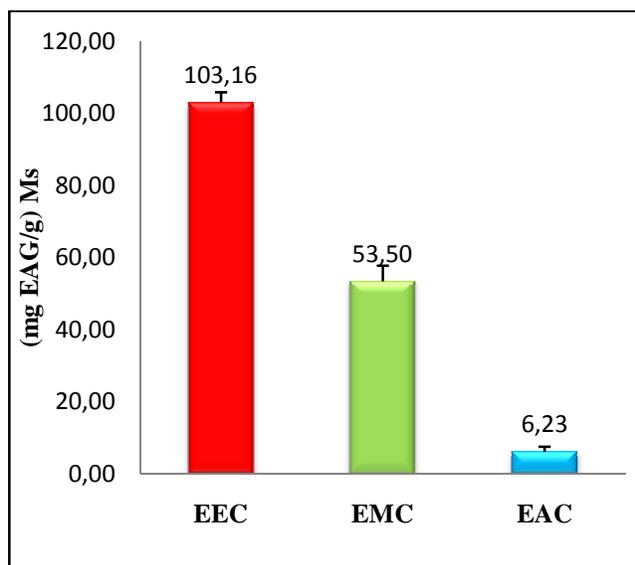


Figure N°5: Teneurs en composés phénoliques de l'extrait éthanolique, méthanolique et aqueux de *Curcuma longa* L.

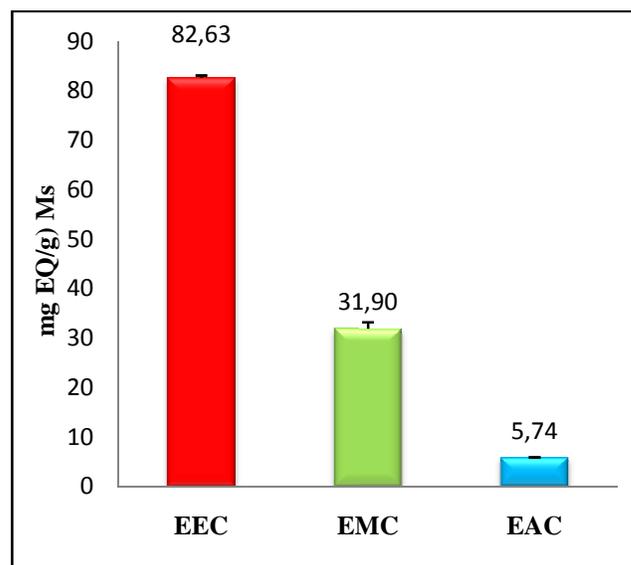


Figure N°6: Teneurs en flavonoïdes de l'extrait éthanolique, méthanolique et aqueux de *Curcuma longa* L.

(Les résultats correspondent à la moyenne \pm ES, de trois essais indépendants)

Résultats et discussions

Ces résultats indiquent que l'extraction par la technique de macération en utilisant ces différents solvants, aboutit à des teneurs en composés phénoliques différentes. Ces teneurs sont de l'ordre de $103,16 \pm 9,11$ mg EAG/g Ms pour l'extrait éthanolique, ($53,50 \pm 1,40$ mgEAG/g Ms) pour l'extrait au méthanol, ($6,23 \pm 0,32$ mg EAG/g Ms) pour l'extrait aqueux.

Parallèlement, le dosage des taux des flavonoïdes diffère d'un extrait à un autre, ces teneurs sont ($82,63 \pm 0,86$ mg EQ/g Ms) pour l'extrait éthanolique, ($31,90 \pm 2,30$ mg EQ/g Ms) pour l'extrait au méthanol et ($5,74 \pm 0,28$ mg EQ/g Ms) pour l'extrait aqueux.

Cette quantification montre que l'extrait éthanolique contient une quantité plus élevée en polyphénols et de flavonoïdes et ce en comparaison avec les extraits méthanolique et aqueux.

Les résultats obtenus corroborent ceux indiqués par **Tanvir** et ses collaborateurs (2017). Ces auteurs, rapportent que la teneur en polyphénols totaux de l'extrait éthanolique (70%) est de 160,07mg EAG/g Ms. Aussi, **Qader et al., (2011)** ; **Tanzeela et al., (2015)** affirment que la teneur en polyphénols de l'extrait éthanolique est plus élevée en comparaison avec l'extrait aqueux.

D'autre étude montre que la teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes des extraits méthanoliques de rhizome de curcuma est de 39,4 mg/EAG et 550 mg EN/g Ms, respectivement (**Alafiatayo Akinola et al., 2014**).

De même que **Ramkumar et Rajasankar , (2016)** rapportent dans leur étude que la teneur en composés phénoliques des extraits méthanolique et aqueux était évaluée à 682,09mg EAG/100g Ms et 494,340 mg EAG/100g Ms respectivement. **Kaur et Kapoor (2002)** ont évalué les composés phénoliques des épices et des légumes asiatiques y compris le *Curcuma longa* pour son application dans différents aliments fonctionnels. Ces chercheurs ont démontré que la teneur en composés phénoliques totaux de curcuma varie de 1,72 à 7,46 g EAG/100gMs.

En outre, **Ghasemzadeh et al., (2012)** révèlent que la quantité de flavonoïdes totaux est de 94 ± 1.0 µg EQ/g Ms. Cette variation dans les teneurs en composés phénoliques entre les différentes études peut être expliquée par les méthodes d'extraction (**Sahne et al. , 2016**).

III.2. Activité antibactérienne

III.2.1. Ré-identification des souches bactériennes étudiées (*Staphylococcus aureus* ATCC 10876, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 et *Escherichia coli* ATCC 10536)

III.2.2. Caractères morphologiques des souches étudiées

L'aspect macroscopique des colonies d'*E.coli* sur milieu Mac Conkey présente un aspect rond, lisse, de couleur rose à bord régulier avec un diamètre de 2 à 3 mm. L'aspect microscopique de ces dernières indique la présence des cellules de forme bacillaire, isolée ou en amas de coloration Gram négative (**Figure N°07**). Par contre, les colonies de *Staphylococcus aureus* obtenues sur milieu Chapman, donne des colonies rondes lisses de couleur jaune orangé, bombées, brillantes de 1 mm de diamètre. Sous microscope, ces colonies présentent des cellules sphériques (cocci), regroupées en amas de coloration Gram positive (**Figure N°07**). En parallèle, l'aspect macroscopique de *Bacillus subtilis* cultivée sur la gélose nutritive donne des colonies blanchâtres, convexes en forme de bâtonnets de 2µm de diamètre et dont la longueur peut atteindre 7µm. Cependant, l'observation microscopique indique la présence des cellules de forme bacillaire regroupées en amas avec une coloration Gram positive (**Figure N°7**).

III.2.3. Caractères biochimiques

Les souches ont été soumises à des tests biochimiques réalisés par le biais du test de catalase et oxydase. Les résultats indiquent qu'*E.coli*, *S.aureus* et *B.subtilis* possédants l'enzyme de catalase. En parallèle, les résultats du test oxydase montrent que les trois souches étudiées ne possèdent pas d'oxydase donc le test est négatif. Ces résultats confirment la pureté des souches utilisées au cours de cette étude (**Delarras, 2007**).

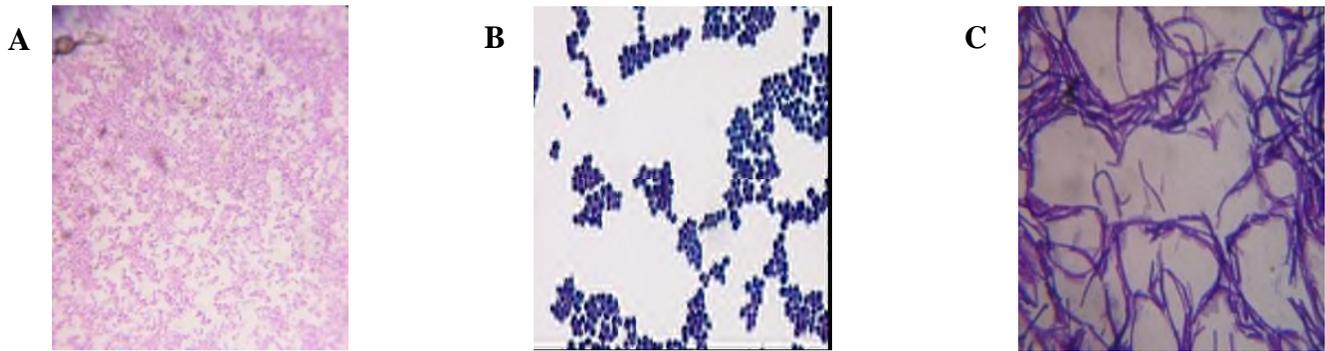


Figure N°07: Aspects microscopiques d'*E. coli*(A), *S. aureus* (B)et *B. subtilis*(C)

III.2.4. Sensibilité des souches bactériennes étudiées (*E.coli*, *B.subtilis*, et *S.aureus*) vis-à-vis des extraits méthanolique et éthanolique de *Curcuma longa* L.

III.2.4.1. Effet antibactérien des extraits méthanolique et éthanolique par la méthode de diffusion sur gélose

Les résultats du test de la sensibilité des souches bactériennes vis à vis des extraits méthanolique et éthanolique de curcuma sont regroupés dans le **tableau N°02**.

L'activité antimicrobienne observée après traitement de nos souches par les composés phénoliques diffère d'une souche à une autre et d'un extrait à un autre. En effet, les extraits réagissent de manières positive et distincte sur les deux souches bactériennes.

L'effet inhibiteur observé est dose-dépendant. Les résultats obtenus montrent clairement la diminution du diamètre des zones d'inhibition correspondant à une diminution de la concentration de l'extrait appliqué, (méthanolique ou éthanolique) et ce pour les souches *E.coli* et *S.aureus*.

Le traitement par ces extraits à des concentrations décroissantes à savoir : 100 ; 50 ; 25 mg/ml induit des zones d'inhibition exprimés en mm, vis-à-vis d'*E.coli* dont les diamètres sont les suivants: $12,5 \pm 0,70$; $11 \pm 1,41$; 10 ± 1 mm pour l'extrait éthanolique et $14,66 \pm 1,52$; 12 ± 1 ; 9 ± 1 mm pour l'extrait méthanolique respectivement.

Résultats et discussions

En parallèle, on constate que les zones d'inhibition suivantes $27 \pm 2,82$; $21 \pm 1,41$; $17,33 \pm 1,52$ mm pour l'extrait éthanolique et 19 ± 2 ; $14,75 \pm 1,52$; 11 ± 1 mm pour l'extrait méthanolique développées vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*.

En parallèle des disques d'antibiotiques ont été utilisés pour étudier le comportement de ces souches bactériennes vis-à-vis de ces antibiotiques. Ces résultats dévoilent que la **Tétracycline (TE³⁰)** et le **Ceftazidime (CAZ³⁰)** exerce un effet inhibiteur sur les deux souches *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, dont les diamètres des zone d'inhibitions situé entre 34,66 et 20,33 mm (**Voir tableau N°02**).

Résultats et discussions

Tableau N°02: Diamètres des zones d'inhibition (mm) induits par les extraits de *Curcuma longa* L. et les antibiotiques.

Concentration (mg/ml) de l'extrait éthanolique		Bactérie à Gram positif (Gram+)		Bactérie à Gram négatif (Gram-)	
		<i>S.aureus</i>		<i>E.coli</i>	
100		27±2,82		12,5±0,70	
50		21±1,41		11±1,41	
25		17,33±1,52		10±1	
Concentration (mg/ml) de l'extrait méthanoliques					
100		19±2		14,66±1,52	
50		14,75±1,52		12±1	
25		11±1		9±1	
Les antibiotiques		Diamètres			
Ceftazidime (CAZ ³⁰)	≥24 :S	<21 :R	22,66	20,33	
Tétracycline(TE ³⁰)	≥19 :S	<17 :R	34,66	15,33	
Témoin négatif(DMSO)	-		-	-	

Les valeurs représentées correspondent à la moyenne ± écart-type de trois essais indépendants)

*(-) absence de zones d'inhibition; S=sensible ; R=résistant

Résultats et discussions

Vu de l'ensemble de ces résultats, on constate que la bactérie à Gram positif utilisée dans cette étude (*S.aureus*) a été plus sensible aux extraits de *Curcuma longa* L. en comparaison avec l'autre bactérie à Gram négatif (*E.coli*). Ces données confirment celles obtenues par **Ajige et al., (2017)**. Ces auteurs ont démontré que *S.aureus*, est sensible à l'extrait éthanolique de curcuma, dont le diamètre de zone d'inhibition compris entre 8 et 11,33 mm en comparaison avec *E.coli* dont le diamètre de zone d'inhibition est compris entre 6,67 et 9,33 mm. Cette résistance de cette bactérie peut être attribuée à la nature de la paroi de cette souche.

III.2.4.2. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) des extraits méthanolique et éthanolique de *Curcuma longa* L. par la méthode de microdilution

Les résultats issus de la méthode de microdilution révèlent que les extraits éthanolique et méthanolique de curcuma sont efficace sur les souches bactériennes testées (*E.coli*, *S.aureus* et *B.subtilis*) (**figure N°08 et N°09**).

Nos résultats montrent une activité antibactérienne importante de l'extrait éthanolique vis-à-vis des souches bactériennes citées précédemment. En effet, ce dernier a présenté une CMI de 0,78 mg/ml et une CMB : 3,12 mg/ml respectivement vis-à-vis *S.aureus* et *B.subtilis*, et une concentration inhibitrice de l'ordre de 3,12 mg/ml pour *E.coli* et une concentration bactéricide de l'ordre de 12,5 mg/ml.

Cependant, des faibles valeurs de CMI et de CMB de l'extrait méthanolique ont été obtenues avec les souches *S.aureus* et *B.subtilis*, on note une CMI de 3,12 mg/ml et 6,25mg/ml pour *S.aureus* et 1,56 mg/ml et 3,12 mg/ml pour *B.subtilis*. Tendit que, la souche *E.coli* est moins sensible à cet extrait avec une concentration inhibitrice de l'ordre de 6,25mg/ml.

Résultats et discussions

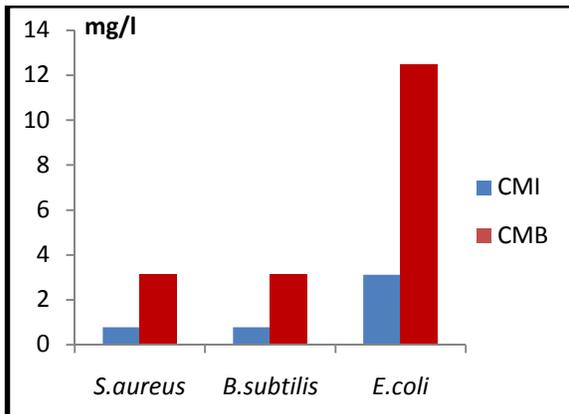


Figure N°08 : CMI et CMB d'extrait éthanolique de *C.longa* vis à vis *S.aureus*, *B.subtilis* et *E.coli*.

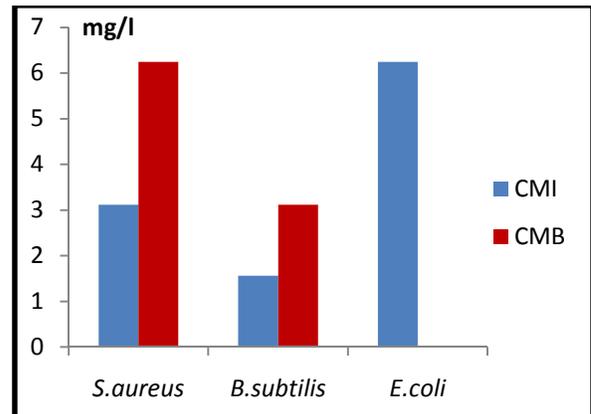


Figure N°09 : CMI et CMB d'extrait méthanolique de *C.longa* vis à vis *S.aureus*, *B.subtilis* et *E.coli*.

Ces résultats sont en accord avec les travaux de **Sasidharan et al ., (2014)**, ces derniers démontrent l'effet de la curcumine contre des bactéries responsables d'une diarrhée infectieuse. En effet, ils rapportent que la curcumine a un effet inhibiteur sur les souches *E.coli*, *S.aureus* et *B.subtilis*. Dont la CMI varie entre 0,25 et 0,5 mg/ml pour *S.aureus*, *B.subtilis* et *E.coli*. Ceci confirme les résultats de **Tajbakhsh** et ses collaborateurs, (2008), ces chercheurs, révèlent que la curcumine est efficace sur *Staphylococcus aureus* avec une CMI de 0,187 mg/ml mais il n'a aucune activité inhibitrice vis à vis *Escherichia coli*.

D'après les résultats obtenus on constate que l'extrait éthanolique enregistre une activité antibactérienne importante vis-à-vis des souches étudiées, la plus remarquable et ce en comparaison avec l'extrait méthanolique. **Fagbemi** et ses collaborateurs en (2009) affirment que l'extrait éthanolique de curcuma possède une meilleure activité inhibitrice contre *E.coli* et *S.aureus* ce qui démontre que la puissance de cette plante a été renforcée par le type de solvants utilisé, ce qui indique que certains des composants actifs présents dans cette plante subissent une meilleure dissolution dans l'éthanol que l'eau.

Résultats et discussions

Oghenejobo et al., (2017) suggèrent que l'effet antimicrobien des composés phénoliques de curcuma (la curcumine) pourraient être responsables à l'efficacité antimicrobienne de ces extraits. Aussi, cet effet est dû partiellement à des perturbations des fractions lipidiques de la membrane plasmique des microorganismes, ce qui provoque une altération de la perméabilité de la membrane et une perturbation de son intégrité et en conséquence la perte de ses organites intracellulaires tels que les protéines, l'ADN, l'ARN, et de l'ATP, la caractéristique physicochimique de ces composés est fortement impliquée dans ce mécanisme (**Dominico et al., 2005**). D'autre étude confirme que le traitement des bactéries pathogènes responsables a des infections nosocomiales par 0,5g/ml de l'extrait méthanolique issu de *curcuma longa* provoque une déformation morphologique, avec un manque partiel de la membrane cytoplasmique, ce qui entraîne une perturbation cellulaire (**Gupta et al., 2015**).

Conclusion

Les métabolites secondaires des plantes sont sources de nombreux produits naturels tels que les épices, les légumes, les herbes et les fruits. A l'heure actuelle, ces molécules fascinent et attirent particulièrement l'attention de la communauté scientifique. Parmi ces substances, les composés phénoliques. En effet, ces derniers, de par leurs activités antibactériennes, antioxydante et anti-inflammatoire, occupent une place d'excellence. Le *Curcuma* (*Curcuma longa* L.) fait partie des épices aux multiples vertus thérapeutiques riches en composés phénoliques.

Ce présent travail s'intéresse à extraire et quantifier les composés phénoliques issus de *Curcuma longa* afin d'évaluer leur activité antibactérienne vis-à-vis des bactéries pathogènes. Les résultats obtenus indiquent que l'extrait éthanolique enregistre le plus grand rendement d'extraction estimé à 12,36% en comparaison aux extraits méthanolique (11,21%), et aqueux (6,24%).

L'analyse quantitative du contenu des polyphénols totaux en adoptant la méthode de Folin-Ciocalteu révèle que l'extrait éthanolique de rhizome de curcuma présente une teneur très élevée évaluée à $103,16 \pm 9,11$ mg EAG/g Ms par rapport à celle de l'extrait méthanolique et aqueux estimée à $53,50 \pm 1,40$ et $6,23 \pm 0,32$ mg EAG/g matière sèche, respectivement. Il va de même pour la quantification des flavonoïdes, des valeurs différentes ont été enregistrées, on constate $82,63 \pm 0,86$ mg EQ/g pour l'extrait éthanolique, $31,90 \pm 2,30$ mg EQ/g pour l'extrait méthanolique et $5,74 \pm 0,28$ mg EQ/g Ms pour l'extrait aqueux.

Le pouvoir antibactérien exprimé par le diamètre des zones d'inhibition obtenues au contact des extraits éthanolique et méthanolique a révélé une activité antibactérienne importante contre *Staphylococcus aureus* avec des diamètres variés entre 27 et 11 mm. Cependant, leurs effet antibactérien sur *Escherichia coli* s'est avéré faible.

En parallèle, l'activité antibactérienne évaluée par la méthode de microdilution montre que ces extraits exercent une activité inhibitrice contre les bactéries *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* avec des valeurs de CMI situées entre 0,78 et 3,12 mg/ml. Par contre leur effet sur *Escherichia coli* est réduit avec des valeurs de CMI situées entre 3,12 et 6,25mg/ml.

L'ensemble des résultats obtenus nous laissent suggérer une possibilité d'exploiter cette matrice végétale comme une solution alternative aux antibiotiques, et ce afin de lutter

contre certaines maladies telles que des infections bactériennes et des troubles gastro-intestinaux.

Ainsi, dans la continuité de ce présent travail les perspectives suivantes peuvent être envisagées

- Adopter d'autres méthodes d'extraction comme par exemple la méthode de soxhlet
- Caractérisation et identification des constituants actifs de curcuma et évaluer leur activités antimicrobiennes contre un plus large éventail des microorganismes pathogènes.

Références
Bibliographiques

A

- **Agric J., (2008)** .Extraction, Processing, and Storage Effects on Curcuminoides and Oleoresin Yields from *Curcuma longa* L. Grown in Jamaica .Journal of agricultural and Food Chemistry ,volume 56,p3664–3670.
- **Ajige L.A., Sunday T.O., Elkanah F. A., Awe A.A., Ayoola S.A.and Sunday R M., (2017)**.Comparative Study of Antibacterial Effects of *Curcuma longa* Linn. And *Zingiber officinale* Rosc. Rhizomes, Microbiology Research Journal International, volume 18(6),p1-8.
- **Akram M., Shahab-Uddin., Ahmed A., Usmanghani K., Hannan A., Mohiuddi E., Asif M., (2010)**.*Curcuma longa* and curcumin: Review article.rom. j. biol. – plant biol., volume 55 (2), p65–70.
- **Alafiatayo Akinola A., Ahmad S., Maziah M., (2014)**. Total Antioxidant Capacity, Total Phenolic Compounds and the Effects of Solvent Concentration on Flavonoid Content in *Curcuma longa*and *Curcuma xanthorrhiza* Rhizomes. Med Aromat Plants volume 3,p156.
- **Alupupui A., Calinescu I., Lavric V.,(2009)**.Ultrasonic vs. Microwave extraction intensification of active principles from medicinal plants.
- **Araújo C.A.C., Leon L.L., (2001)**.Biological Activities of *Curcuma longa* L. Mem. Inst. Oswaldo Cruz-Fiocruz , volume 96(5) , p723-728 .

B

- **Bahorun T., Grinier B., Trotin F., Brunet G., Pin T., Luncky M., Vasseur J., Cazin M., Cazin C.and Pinkas M., (1996)**. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations .Arzneimittel-Forschung. p1086-1089.
- **Bonnaillie C .,Salacs M., Vassiliova E., Saykova I ., (2012)**. Etude de l'extraction de composés phénoliques à partir de pellicules d'arachide (*Arachishypogaea* L .) , Revue de génie industriel,volume 7, p 35-45.
- **Borget Marc ., (1970)**. Les plantes tropicales à épices. Editions Maisonneuve et Larose .p40.

C

- **Chattopadhyay I., Biswas K., Bandyopadhyay U. and Banerjee R .K .(2004).**, Turmeric and curcumin: Biological actions and medicinal applications, Current science, volume 87(1), p44-53.
- **Cooper K.E. and Woodman D., (1946).** The diffusion of antiseptics through agar gels, with special reference to the agar cup assay method of estimating the activity of penicillin. J. Path. Bact. p 58-75.
- **Chainani-Wunita., (2003).** Safety and Anti-Inflammatory Activity of Curcumin: A Component of Tumeric (*Curcuma longa*). The Journal Of Alternative And Complementary Medicine ,volume 9(1), p. 161–168.

D

- **Delarras C., (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire. Editions TEC & DOC (lavoisier). p 476.
- **Domenico T., Francesco C., Maria G.S., Vincenza V., Mariateresa C.D., Antonella S., Gabriela M. and Giuseppe B.,(2005).** Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, volume 49 : p2474-2478.

F

- **Fagbemi ., Ferdinand J., Ugoji., Esther ., Adenipekun ., Tayo ., Adelowotan ., Omotoyin., (2009).** Evaluation of the antimicrobial properties of unripe banana (*Musa sapientum* L.), lemon grass (*Cymbopogon citratus* S.) and turmeric (*Curcuma longa* L.) on pathogens , African Journal of Biotechnology , volume 8 (7), p 1176-1182.
- **Fahmi Ismail H ., Hashim Z ., Tet Soon W ., AbRahman N.S ., Zainudin A.N ., Abdul Majid F.A., (2017).** Comparative study of herbal plants on the phenolic and flavonoid content, antioxidant activities and toxicity on cell and zebrafish embryo. Journal of Traditional and Complementary Medicine, volume 7, p 452-465.

G

- **Gupta A., Mahajan S., Sharma R., (2015).** Evaluation of antimicrobial activity of *Curcuma longa* rhizome extract against *Staphylococcus aureus*. Biotechnology Reports , volume 6, p 51–55.
- **Ghasemzadeh A., and Jaafar H.Z.E., (2011).** Antioxidant potential and anticancer activity of young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) grown under different CO₂ concentration. Journal of Medicinal Plants Research , volume 5(14), p 3247-3255.

- **Ghasemzadeh A., Azarifar M., Soroodi O. and Jaafar H.Z.E., (2012).** Flavonoid compounds and their antioxidant activity in extract of some tropical plants. *Journal of Medicinal Plants Research*, volume 6(13), p. 2639-2643.

- **Green E.C., Hibbert S.L., Bailey-Shaw Y.A., Williams Lawrence A.D., Mitchell. and Garraway E., (2008).** Extraction, Processing, and Storage Effects on Curcuminoids and Oleoresin Yields from *Curcuma longa L.* Grown in Jamaica. *Journal. Agricultural and Food Chemistry*, volume 56, p3664–3670.

I

- **Iserin P., (2001).** LAROUSSE Encyclopédie des plantes médicinales. Identification, préparations, soins. 2^{ème} Edition ; Paris p.15.

J

- **Jourdan J.P., (2015).** *Curcuma* et Curcumine : de l’histoire aux intérêts thérapeutiques, Thèse pour le diplôme d’état de docteur en pharmacie. université de CAEN.

K

- **Kaur, C. and H.C. Kapoor., (2002).** Antioxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *Int. J. Food Sci. Technol*, volume 37: p153-161.

- **Klančnik A., Piskernik S., Jeršek B., Možina S.S., (2010).** Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Method*, volume 81.p121–126.

- **Kodjio N., Atsafack S.S., Siméon P.C. Fodouop., Kuate J.R. and Gatsing D., (2016).** In vitro Antisalmonella and Antioxidant Activities of Extracts and Fractions of *Curcuma longa L.* Rhizomes (Zingiberaceae). *International Journal of Biochemistry Research & Review*, volume 11(3): P1-14.

L

- **Larpent J.P., (1997).** Microbiologie alimentaire: Technique de laboratoire. Tec&Do, Le Bras, G.J., 2007. Ecotoxicologie et méthodes d’investigation « les bio- indicateurs » version 2.0, Isa & Université Catholique de Lille. 472p.

- **Leong-Škorničková J., Šída O., Sabu M., Marhold K., (2008).** Taxonomic and nomenclatural puzzles in Indian *Curcuma*: the identity and nomenclatural history of *C. zedoaria* (Christm.) Roscoe and *C. zerumbet* Roxb. (Zingiberaceae). *Taxon*, volume 57 (3) : p949–962.

M

- **Mahmoudi S., Khali M., Mahmoudi N., (2013).** Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynaras colymus L.*) ,Nature & Technologie, n° 09, p 35 à 40 .
- **Maizura M., Aminah A.and Wan Aida W.M.,(2011).**Total phenolic content and antioxidant activity of kesum (*Polygonum minus*), ginger (*Zingiber officinale*) and turmeric (*Curcuma longa*) extract.International Food Research Journal ,volume 18:p 526-531.

N

- **Nelson K.M.,Dahlin J.L., Bisson J., Graham J., Pauli G.F.and Walters M.A.,(2017).**The Essential Medicinal Chemistry of Curcumin .Journal of Medicinal Chemistry, volume 60, p1620–1637.
- **Nurcholis W., AjruddinMunshif A., Ambarsari L., (2017).** Xanthorrhizol contents-glucosidase inhibition, and cytotoxic activities in ethyl acetate fraction of *Curcuma zanthorrhiza* accessions from Indonesia. Brazilian Journal of Pharmacognosy,p 6.

O

- **Oghenejobo M., Opajobi OA., Bethel OUS., Uzoegbu U.,(2017).** Antibacterial Evaluation, Phytochemical Screening and Ascorbic Acid Assay of Turmeric (*Curcuma longa*).MOJ Bioequiv Availab volume 4(2).
- **Orliac C. (2002).** Le Dieu Rao de Mangareva et le *Curcuma longa* .Le Journal de la Société des Océanistes,p114-115.

P

- **Philippe Gilet ., Luc Boel ., Jan Jacobs.,(2009).** Bactériologie medical Tropicale Postgraduat en Medecine tropicale et santé internationnale Module 1 et 2Nationale straat, 155 B-2000 Atwerpen.
- **Priyadarsini K.I. , (2014).** The Chemistry of Curcumin: From Extraction to Therapeutic Agent. Molecules,volume 19, p 20091-20112.

Q

- **Qader S.W., Abdulla M.A., Chua L.S., Najim N., Zain M.M. and Hamdan S., (2011).** Antioxidant, Total Phenolic Content and Cytotoxicity Evaluation of Selected Malaysian Plants. *Molecules*, volume 16, p3433-3443.

R

- **Rachana G., Pooja A. and Dr. Pathak A.K., (2015).** Comparative Antimicrobial and Hematological Activity of Different Leaves and Rhizome Extract of *Curcuma longa*. *World Journal of Pharmaceutical*, volume 4(8), p1249-1266.
- **Ramkumar M., Rajasankar S., (2016).** Analysis of total phenolics and antioxidant activity of alcoholic and an aqueous extract of south Indian *Curcuma longa* rhizome.
- **Rarnsewak R.S., Dewitt D.L., Nair M.G., (2000).** Cytotoxicity, antioxidant and anti-inflammatory activities of Curcumins I-III from *Curcuma longa* L., *Phytomedicine*, volume 7(4), p 303-308.
- **Ravindran P.N., Babu Nirmal K., Sivaraman K., (2007).** Turmeric: The Genus *Curcuma*; CRC Press 39-264.

S

- **Sahne F., Mohammadi M., Najafpour G.D. and Moghadamnia A.A., (2016).** Extraction of Bioactive Compound Curcumin from Turmeric (*Curcuma longa* L.) via Different Routes: A Comparative Study. *Pak. J. Biotechnol*, volume 13 (3), p173 - 180.
- **Sasidharan N.K., Sreekala S.R., Jacob J. and Nambisan B., (2014).** In Vitro Synergistic Effect of Curcumin in Combination with Third Generation Cephalosporins against Bacteria Associated with Infectious Diarrhea. *BioMed Research International*, p8
- **Schroder M.P., Messing A.M., (1949).** Methods for comparing the antibacterial activity of essential oils and other aqueous insoluble compounds. *Bull nat Formulary comm.* volume 17, p218.
- **Singleton V., Orthofer R. and Lamuela-Raventos R., (1999).** Analysis of Total Phenols and other Oxidation Substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Method of enzymology*, volume 299, p 152-178.

- **SoniHimesh., Sharan P.S., Mishra K., Govind N., Singhai AK., (2011).** Qualitative and quantitative profile of Curcumine from ethanolic extract of *Curcuma longa* .International research journal of pharmacy, volume 2(4). p180-184.

T

- **Tajbakhsh S., Mohammadi k., Deilami I., Zandi K., Fouladvand M., Ramedani E.and Asayesh G., (2008).** Antibacterial activity of indium curcumin and indium Diacetylcurcumin. African Journal of Biotechnology ,volume 7 (21),p. 3832-3835.
- **Tanvir E.M., Hossen S., Hossain F., Afroz R., HuaGan S., Khalil I., Karim N., (2017).** Antioxidant Properties of Popular Turmeric (*Curcuma longa*) Varieties from Bangladesh. Journal of Food Quality, volume 2017,p8.
- **Tanzeela N., Iqbal M., Raza A., Safdar M., Iftikhar F.and Wahee M., (2015).** Estimation of Total Phenolics and Free Radical Scavenging of Turmeric (*Curcuma longa*).American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci, volume 15 (7): p1272-1277.
- **Teuscher E., Anton R., Lobstein A., (2005).** Plantes aromatique Epice ,aromates, condiments et huiles essentielles. Editions TEC & DOC (lavoisier).p216 .

V

- **Viviane., Paulucci P., RenêO.Couto., Cristiane C.C. Teixeira., Luis Alexandre P.Freitas.,(2013).** Optimization of the extraction of curcumin from *Curcuma longa* rhizomes .Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy ,volume 23(1):p 94-100 .

Annexes

Annexe I

I.1 Composition des milieux de cultures utilisés

- **Gélose nutritive:**

Pour 1 litre de milieu :

Tryptone.....	5,0g
Extrait de viande	1,0g
Extrait de levure.....	2,0g
Chlorure de sodium.....	5,0g
Agar.....	12,0g

(Delarras, 2007).

- **Milieu Chapman:**

Pour 1 litre de milieu :

Tryptone.....	5,0g
Peptone pepsique de viande.....	5,0g
Extrait de viande.....	1,0g
Chlorure de sodium	75,0g
Mannitol.....	10,0g
Rouge de phénol.....	25,0mg
Agar	15,0g

(Delarras, 2007).

- **Milieu de Mueller-Hinton:**

Pour 1 litre de milieu :

Infusion de viande de bœuf.....	300g
Hydrolysate de caséine	17,0g
Amidon	1,5g
Gélose.....	17g

- **Milieu Mac Conkey:**

Pour 1 litre de milieu :

Tryptone pancréatique de gélatine.....	17,0g
Tryptone.....	150g
Peptone pepsique de viande	150g
Lactose	10,0g
Sels biliaires.....	1,5g
Chlorure de sodium.....	5,0g
Rouge neutre.....	30mg
Cristal violet.....	1,0mg
Agar	13,5g

pH du milieu prêt- à l'emploi à 25°C:±0,2.

(Delarras, 2007)

Annexe II

II.1 Coloration de Gram

- Déposer une goutte d'eau distillée sur une lame propre
- Prélever une colonie à l'aide d'une pipette pasteur boutonnée.
- Dissocier soigneusement l'inoculum dans la goutte d'eau distillée et laisser sécher.
- Fixer l'échantillon à la chaleur.
- Déposer quelques gouttes de solution de Violet de gentiane phénique sur le frottis fixé, et laisser agir 1 minute.
- Rincer très brièvement en faisant couler de l'eau distillée sur la lame au-dessus du frottis (pas directement sur le frottis).
- Déposer quelques gouttes de Lugol, laisser agir 1 minute.
- Rincer à l'eau distillée et éliminer l'excès d'eau.
- Décolorer avec un mélange d'alcool et d'acétone.
- Rincer abondamment à l'eau distillée.
- Contre-colorer en déposant la solution de la Fuchsine de Ziehl 1/10 et laisser agir une minute.
- Rincer à l'eau distillée.
- Laisser sécher à l'air puis observer au microscope (objectif X 100 à immersion).

Annexe III

Courbes d'étalonnage de l'Acide gallique et de la Quercétine

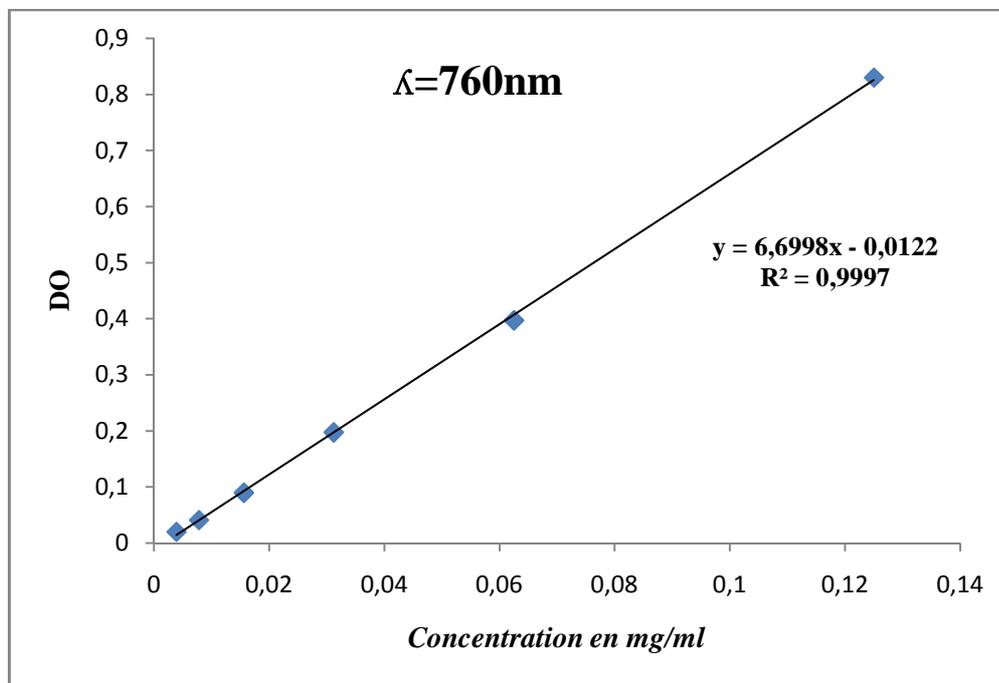


Figure : Courbe d'étalonnage l'acide gallique

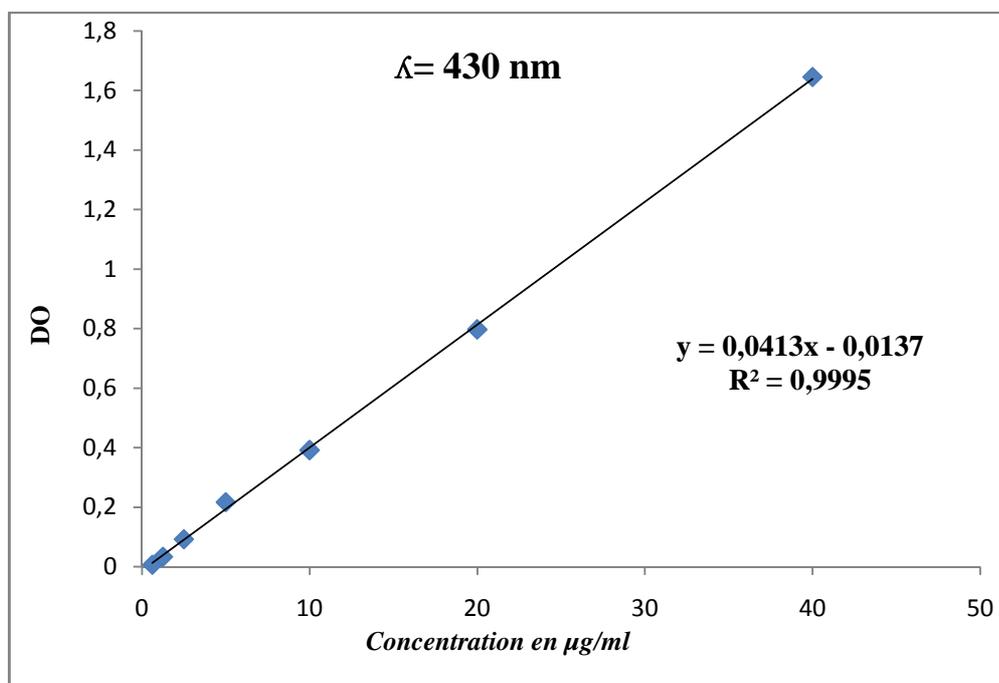
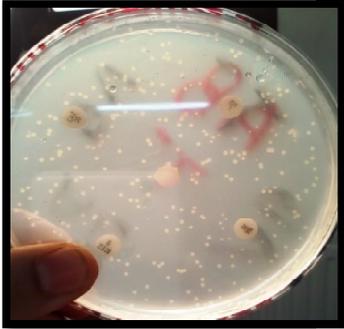


Figure : Courbe d'étalonnage de la Quercétine

Annexe IV

IV.1 Effets des antibiotiques et de DMSO sur les souches testés.

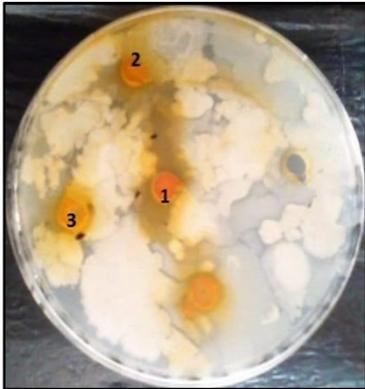


Antibiotique vis-à-vis *E.coli*



Antibiotique vis-à-vis *S.aureus*

IV.2 Résultats d'effet antibactérien des extraits méthanolique et éthanolique par la méthode de diffusion sur gélose



(A)



(B)

1)100mg/ml; 2)50mg/ml; 3)25mg /ml



(A)



(B)

1)100mg/ml; 2) 50mg /ml; 3)25mg/ml

Figure: Zones d'inhibition exprimé en mm induites par l'extrait méthanolique *C.longa* (100 ;50 ; 25mg/ml) vis-à-vis *E .coli*(a)et *S.aureus* (b).



Curcuma longa L. selon Eberhard et al., (2005) .

