

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche scientifique
Université MOULOUD MAMMERRI de Tizi-Ouzou



Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques

Département de Biochimie et de Microbiologie

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master Académique en Biologie

Option : Microbiologie Appliquée

Thème

**L'activité antioxydante et antibactérienne de l'extrait aqueux
d'*Artemisia herba alba***

Travail réalisé par :

M^{elle} : Charif Nesrine

M^{elle} : Louizini lynda

Devant le jury :

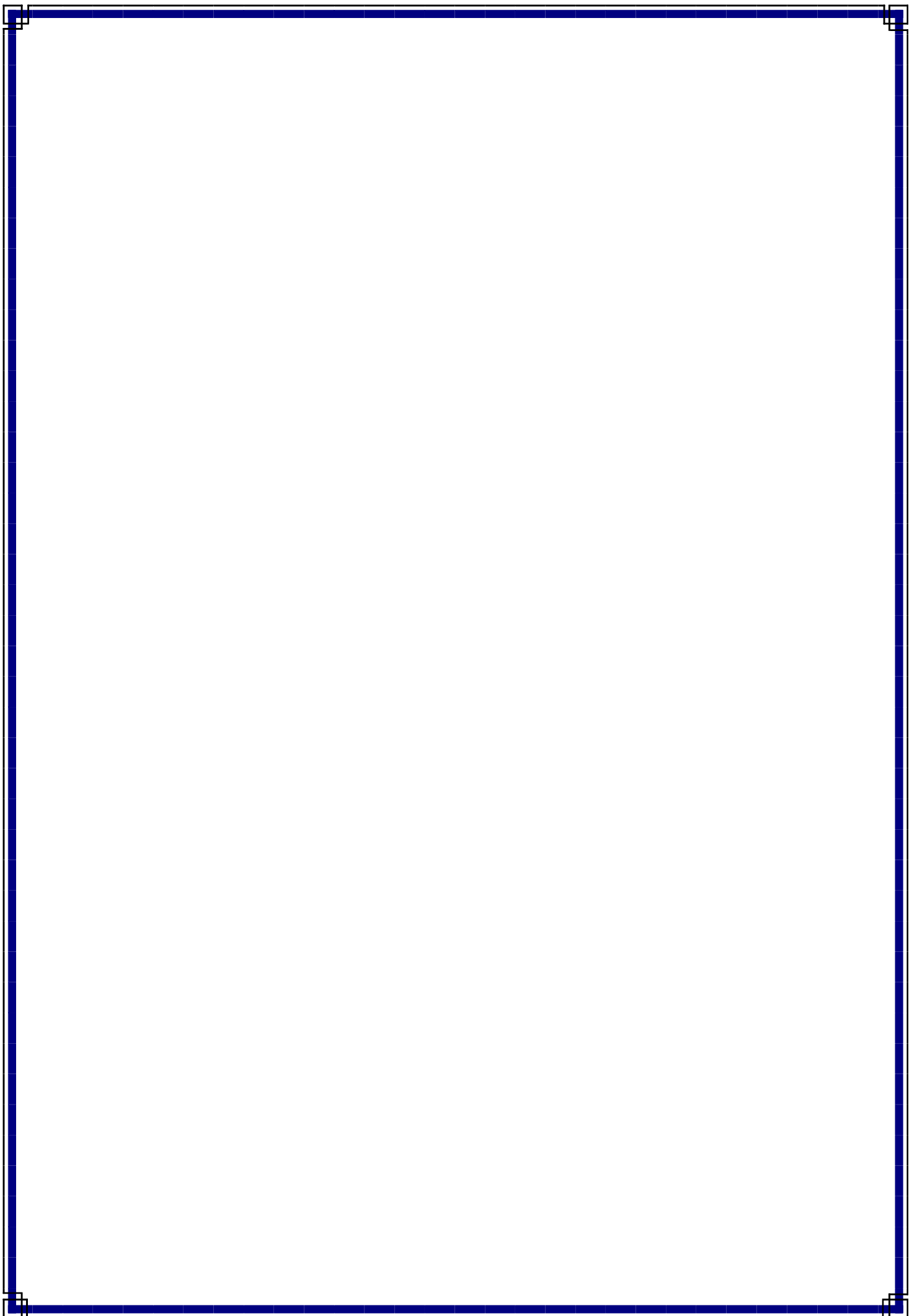
Président : M^{me} ZENNIA SALIHA : Maître-assistante classe A à l'UMMTO.

Examineur : M^{me} HELLAL ZOHRA : Maître-assistante classe A à l'UMMTO.

Examineur : M^{me} BENZAOUZ KINZA : Maître-assistante classe A à l'UMMTO.

Promoteur : M^r SEBBANE HILLAL : Maître-assistant classe A à l'UMMTO.

Année universitaire : 2015 - 2016



Remerciements

Nous tenons à remercier en premier lieu le bon Dieu de nous avoir donnés la santé, la volonté, la foi et le courage pour réaliser ce travail.

Nous tenons à remercier également toutes les personnes qui nous ont aidés et soutenus en particulier :

*Notre promoteur : **Monsieur SEBBANE HILLAL** : Maître-assistant classe A à l'UMMTO, pour avoir accepté de diriger notre travail par ses conseils, sa disponibilité et ses orientations.*

***Monsieur BARIZ KARIM** : Maître-assistant classe A à l'UMMTO, qui nous a vraiment aidé dans ce travail.*

***Madame ZENNIA SALIHA** : Maître-assistante classe A à l'UMMTO, pour avoir acceptée de présider le jury.*






***Madame HELLAL ZOHRA** : Maître-assistante classe A à l'UMMTO, pour avoir accepté d'examiner notre travail.*

***Madame BENZAOUZ KINZA épouse KESBIA** : Maitre-assistante A à l'UMMTO, pour avoir accepté d'examiner notre travail.*

Enfin toute notre sympathie et nos remerciements vont également à tous ceux et celles, qui de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce mémoire.






Dédicace

Je dédie ce travail :

-  *à mes chers parents, qu'ils trouvent ici ma plus profonde gratitude et tout mon amour ;*
-  *à mon frère et mes sœurs ;*
-  *à toute ma famille élargie ;*
-  *à mes cousins et cousines, plus particulièrement Kahina ;*
-  *à tous mes ami(e)s en particulier Rafik, Lydia, Lynda, Lila, Dehbia, Sarah.*

Nesrine

Je dédie ce travail :

-  *à mes chers parents, qu'ils trouvent ici ma plus profonde gratitude et tout mon amour ;*
-  *à mon frère et mes sœurs ;*
-  *à toute ma famille élargie ;*
-  *à mes cousins et cousines ;*
-  *à tous mes ami(e)s en particulier Sarah, Lydia, Lynda, Lila, Dehbia.*

Lynda

Sommaire

Résumé	
Liste des abréviations	
Index des tableaux	
Index des figures	
Introduction	

Première partie : Synthèse bibliographique

Chapitre I : Présentation de la plante d'*Artemisia herba alba*

I- Généralités.....	2
I-1- Origine.....	2
I-2- Taxonomie et classification	2
I-3- Description botanique.....	3
I-4- Composition chimique.....	4
I-5- Répartition géographique.....	4
I-6- Ecologie de la plante.....	4
I-7- Usage de la plante.....	5
I-7-1 Usage phyto-thérapeutique.....	5
I-7-2- Usage alimentaire.....	5

Chapitre II : Les métabolites secondaires d'*Artemisia herba alba*

II-1 Composés phénoliques.....	6
II-1-1 Polyphénols.....	6
II-1-1-1 Acides phénoliques.....	7
II-1-2 Les flavonoïdes.....	8
II-1-2-1 Classification.....	9
II-1-3 Les tanins.....	10
II-1-3-1 Classification.....	11
II-1-3-1-1 Tanins hydrolysables.....	11
II-1-3-1-2 Tanins condensés.....	11
II-1-3-2 Les activités biologiques des tanins.....	12
II-2 Les sesquiterpènes lactones.....	13
II-3 L'huile essentielle.....	13
II-3-1 Les Activités biologiques des huiles essentielles.....	14

Sommaire

II-3-1-1 les activités antimicrobiennes.....	14
II-3-1-2 Activité antivirale.....	14
II-3-1-3 activité antioxydante.....	14
II-3-1-4 activité anti-inflammatoire.....	14

Chapitre I : Les activités biologiques d'*Artemisia herba alba*

III-1 Les activités antimicrobiennes.....	15
III-1-1 Activités antibactériennes.....	15
III-1-2 Activités antifongiques.....	15
III-2 Les activités antioxydantes.....	16
III-2-1 Le stress oxydatif.....	16
III-2-2 Les radicaux libres.....	16
III-2-3 Les espèces réactives de l'oxygène.....	16
III-2-3-1 Le radical superoxyde.....	16
III-2-3-2 Le radical hydroxyle.....	17
III-2-3-3 Le peroxyde d'hydrogène.....	17
III-2-4 Les antioxydants.....	18
III-2-4-1 Les antioxydants endogènes.....	18
III-2-4-2 Les antioxydants exogènes.....	19
III-2-4-2-1 Les vitamines.....	19
III-2-4-2-2 Antioxydants d'origine végétale.....	20
III-2-5 Les maladies liées au stress oxydatif.....	20
III-2-6 Autres activités	21

Deuxième partie : Matériel et méthodes

I- Matériel et méthodes.....	23
I-1 Matériel.....	23
I-1-1 Matériel végétal.....	23
I-1-2 Matériel de laboratoire.....	24
I-1-2-1 Les différents produits chimiques et milieux de culture utilisés.....	24
I-1-2-2 Souches bactériennes utilisées.....	25
I-1-2-3 Antibiotiques utilisés.....	26
I-2 Méthodes.....	26
I-2-1 Préparation de l'extrait aqueux d' <i>Artemisia herba alba</i>	26
I-2-2 Détermination du rendement d'extraction.....	27
I-2-3 Détermination de la concentration maximale de l'extrait aqueux.....	27

Sommaire

I-2-4 Analyses quantitatives de l'extrait aqueux.....	28
I-2-4-1 Dosage des polyphénols totaux.....	28
I-2-4-2 Dosage des flavonoïdes.....	30
I-2-5- Mise en évidence et dosage des tanins.....	32
I-2-5-1 Screening phytochimique des tanins.....	32
I-2-5-2 Dosage des tanins.....	32
I-2-6 Tests des activités biologiques.....	34
I-2-6-1 Test de l'activité antioxydante.....	34
I-2-6-1-1 Test de piégeage du radical libre DPPH.....	34
I-2-6-1-2 Test de la réduction du fer FRAP.....	36
I-2-6-2 Test de l'activité antibactérienne.....	39
1/ Les souches bactériennes utilisées.....	39
1-1/ Vérification de la pureté des souches testées.....	39
1-2/ Conservation des souches.....	42
2/ Evaluation de l'activité antibactérienne.....	42
I-2-7 Analyse statistique.....	44

Troisième partie : Résultats et discussion

1- Rendement d'extrait.....	45
2- Résultats de l'étude quantitative.....	45
2-1 Dosage des polyphénols totaux.....	45
2-2 Dosage des flavonoïdes.....	47
2-3 Mise en évidence de la présence des tanins.....	48
2-3-1 Screening phytochimique.....	48
2-3-2 Dosage des tanins.....	50
3- Résultats des tests des activités biologiques.....	51
3-1 Test de l'activité antioxydante	51
-Test de piégeage du radical libre DPPH.....	51
-Test de la réduction du fer FRAP.....	52
3-2 Test de l'activité antibactérienne.....	54
3-2-1 Identification et purification des souches.....	54
3-2-1-1 Caractère morphologique.....	54
4-2-1-2 Critères biochimiques.....	55

Sommaire

4-2-2 Méthode de diffusion en milieu solide	58
4-2-2-1 Déterminations de la CMI.....	58
4-2-2-2 La détermination de la sensibilité des souches testées.....	60
Conclusion.....	61
Références bibliographiques	
Annexes	

Sommaire

Résumé

Artemisia herba alba est une plante médicinale appartenant à la famille des *Astéracée*, cette espèce connue sous le nom de « chih », est très répandue dans le sud algérien. Plante très utilisée en médecine traditionnelle pour ses nombreuses vertus.

L'extrait aqueux a été obtenu par macération en utilisant l'eau distillée. Le rendement a été estimé de $18.8 \pm 0.80\%$.

La teneur totale en composés phénolique a été déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, elle est de 0.821 ± 0.061 mg EAG/g Ps. Les flavonoïdes ont été évalués en utilisant la méthode $AlCl_3$, la teneur est de 0.055 ± 0.0053 mg EQ/g Ps mg. La mise en évidence des tanins a été réalisée par deux méthodes : le screening phytochimique en utilisant le réactif de Stiasny et le $FeCl_3$, qui a révélé la présence des tanins galliques et catéchiques et la teneur en tanins qui est de $7.99 \times 10^{-5} \pm 1.96 \times 10^{-6}$ mg EAT/g Ps, a été déterminé en utilisant le réactif de Folin Denis.

L'activité antioxydante a été évaluée en utilisant deux méthodes différentes: la technique de la réduction du fer FRAP et la méthode de réduction de radical libre DPPH. Pour le premier test le $PR_{0.5}$ a été estimée à 0.024mg/ml pour l'extrait aqueux, alors que celui du contrôle positif est de 0.048mg/ml. Pour le second test, un pourcentage d'inhibition de 4.34% a été obtenu à une concentration de 0.8mg/ml de l'extrait aqueux, alors que celle du contrôle positif est de 0.66mg/ml.

L'activité antibactérienne a été déterminée sur huit souches bactériennes, selon la méthode de diffusion de disque. La concentration minimale inhibitrice (CMI) manifestée par l'extrait aqueux sur *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Klebsiella pneumoniae* 825, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* ATCC 25922 est de 0.4g/ml et de 0,8g/ml pour *Klebsiella pneumoniae* 1766, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352, *Staphylococcus aureus* ATCC 2592. L'extrait aqueux a un effet sur les souches bactériennes testées, ce qui confirme que la plante *Artemisia herba alba* est doué de propriétés antimicrobiennes.

Mots clés : *Asteraceae*, *Artemisia herba alba*, extrait aqueux, activité antioxydante, activité antimicrobienne

Abstract

Artemisia herba alba is a medicinal plant belonging to the Asteraceae family, this species known as « chih » is very widespread in the south of Algeria. Plant widely used in folk medicine for its many virtues.

Aqueous extract was obtained by maceration with distilled water. The yield was: $18.8 \pm 0.80\%$.

Total phenolic contents were determined using Folin-Ciocalteu reagent, it was: 0.821 ± 0.061 mg AGE/g Ps. The flavonoïd contents was determined using a method $AlCl_3$, it was: 0.055 ± 0.0053 mg QE/g. Highlighting tannins was carried out by two methods: the phytochemical screening using Stiasny reagent and $FeCl_3$, which revealed the presence of gallic tannins and catechin and tannin content which is $7.99 \times 10^{-5} \pm 1.96 \times 10^{-6}$ mg EAT/g Ps was determined using the Folin Denis reagent.

The antioxidant activity was evaluated using two different methods: the technique of reducing the iron FRAP and DPPH free radical reduction method. For the first test the $PR_{0.5}$ was estimated at 0.024mg/ml for the aqueous extract, whereas the positive control is of 0.048mg/ml. For the second test, a percentage of inhibition of 4.34% was obtained at a concentration of 0.8mg/ml of aqueous extract, whereas the positive control is 0.66mg/ml.

Antimicrobial activity was determined using eight bacterial strains according to the disk diffusion assay; the minimal inhibitory concentration (MIC) was 0.4g/ml for aqueous extract when tested on *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Klebsiella pneumoniae* 825, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Klebsiella pneumoniae* 825, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* ATCC 25922, and was 0,8g/ml against *Klebsiella pneumoniae* 1766, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352, *Staphylococcus aureus* ATCC 2592.

All the microorganisms tested were sensitive to the aqueous extract, confirming that the *Artemisia herba alba* plant is endowed with antimicrobial properties.

Key words: Asteraceae, *Artemisia herba alba*, aqueous extrac, antioxidant activity, antimicrobial activity.

Liste des abréviations

Absr: Absorbance

AC: Acide.

AG: Acide gallique.

AM /AX: Amoxicilline.

AT: Acide Tannique..

ATCC: American Type Culture Collection.

B. cereus: *Bacillus cereus*.

CMI: Concentration minimale inhibitrice.

CZ: Cefazoline.

DO: Densité optique.

DPPH: 1.1- diphényl-2-picryl-hydrazyl.

EAG: Equivalent d'acide gallique.

EAT: Equivalent d'acide tannique.

E. coli: *Escherichia coli*.

ED: Eau Distillée.

Eq: Extrait aqueux.

EQ: Equivalent de quercétine.

ERO: Espèces réactives de l'oxygène.

FRAP: Réduction du fer.

HE: Huile essentielle.

IC 50: Concentration inhibitrice 50.

IPNI: The international plant name Index.

K.pneumoniae: *Klebsiella pneumoniae*.

MH: Muller-Hinton.

MS: Matière sèche.

NADP: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.

O₂*- : Radical superoxide.

***OH**: Radical hydroxyle.

PCA: Plate Count Agar.

PPT: Polyphénols totaux.

PP: Polyphénols.

PR: Pouvoir Réducteur.

Ps: Pois sec.

Q: Quercitine.

R: Rendement.

RSA: Radical Scavenger Activity.

SM: Solution Mère.

SOD: Superoxyde dismutase.

SS: Salmonella-Shigella.

SXT: Trimethoprim+Sulfamethoxazole.

SXT: Trimethoprim /Sulfamethoxazole.

UV: Ultra-Violet.

VRBG: Glucose Biliée au cristal Violet et au Rouge neutre.

VRBL: Lactose Biliée au cristal Violet et au Rouge neutre.

Ø: diamètre.

Index des tableaux

Numéro du tableau	Titre du tableau	page
Tableau I	Classification de la plante d' <i>Artemisia herba alba</i> .	3
Tableau II	Principales classes des flavonoïdes.	9
Tableau III	Produits chimiques et milieux de culture utilisés.	24
Tableau IV	Les souches bactériennes utilisées et leurs provenances.	25
Tableau V	Les antibiotiques utilisés comme témoins positifs.	26
Tableau VI	Préparation des dilutions d'acide gallique.	28
Tableau VII	Préparation des dilutions de la quercetine.	30
Tableau VIII	Préparation des dilutions de l'acide tannique.	33
Tableau IX	Préparation des dilutions de l'acide ascorbique.	35
Tableau X	Préparation des dilutions de l'acide ascorbique.	37
Tableau XI	Les tests réalisés pour la confirmation de la pureté de chaque souche bactérienne.	39
Tableau XII	Sensibilité des bactéries envers les différents composés.	44
Tableau XIII	Aspect, couleur et rendement d'extrait aqueux d' <i>Artemisia herba alba</i> (n=4).	45
Tableau XIV	Résultat de la coloration de Gram et l'aspect des colonies des différentes souches bactériennes utilisées.	55
Tableau XV	Résultats des galeries testés.	56
Tableau XVI	Résultats des deux tests (oxydase, catalase) pour toutes les souches utilisées.	57
Tableau XVII	Diamètre des zones d'inhibitions en mm de l'extrait aqueux d' <i>Artemisia herba alba</i> (n=4).	59
Tableau XVIII	Degrés de sensibilité des souches testées.	61

Index des figures

Numéro de la figure	Titre de la figure	Page
Figure 1	Photos d' <i>Artemisia herba alba</i> .	2
Figure 2	L' <i>Artémisia herba alba</i> de la région de Biskra.	3
Figure 3	Exemples des dérivés d'acides hydroxybenzoïques.	7
Figure 4	Exemples des dérivés d'acides hydroxycinnamiques.	8
Figure 5	Structure de base des flavonoïdes.	9
Figure 6	Structure de base des flavanones.	10
Figure 7	Structure de base des flavonols.	10
Figure 8	Exemples des quelques tanins.	11
Figure 9	Classification des tanins.	12
Figure 10	Photos de la partie aérienne d' <i>Artemisia herba alba</i> récoltée (Assekrem, Tamanrasset) (3264× 1836).	23
Figure 11	Schéma du protocole d'extraction de l' <i>Artemisia herba alba</i> .	27
Figure 12	Protocole de dosage des polyphénols totaux.	29
Figure 13	Protocole de dosage des flavonoïdes.	31
Figure 14	Protocole de dosage des tannins.	33
Figure 15	Schéma de transformation du DPPH de sa forme active à celle inactive.	35
Figure 16	Protocole de piégeage du radical libre DPPH.	36
Figure 17	Protocole du test de la réduction de fer.	38
Figure 18	Photos représentant la galerie API 20E .	41
Figure 19	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.	46
Figure 20	Courbe d'étalonnage de la quercétine.	47
Figure 21	Révélation des tanins catéchiqes et des tanins gallique.	49
Figure 22	Courbe d'étalonnage de l'acide tannique.	50
Figure 23	Pouvoir antioxydant de l'acide ascorbique.	51
Figure 24	Pouvoir réducteur de l'extrait aqueux et de l'acide ascorbique.	53

Figure 25	Effet de l'extrait aqueux sur les huit souches testées.	61
------------------	---	-----------

Introduction

Introduction

Les plantes médicinales sont utilisées depuis l'antiquité, pour soulager et guérir les maladies humaines. En fait, leurs propriétés thérapeutiques sont dues à la présence de centaines, voire des milliers de composés naturels bioactifs appelés: les métabolites secondaires. Ces derniers sont par la suite accumulés dans différents organes et parfois dans des cellules spécialisées de la plante.

Actuellement, le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques et la toxicité des antioxydants synthétiques ont conduit les chercheurs à puiser dans le monde végétal et particulièrement les plantes médicinales en quête de molécules naturelles efficaces et dénuées de tout effet adverse.

De nombreuses études ont mis en évidence la présence de métabolites secondaires doués d'activités biologiques telles que les polyphénols, alcaloïdes, terpènes, ...etc.

L'Algérie possède une flore végétale riche et diversifiée. Parmi les plantes médicinales qui constituent le couvert végétal, se trouve le genre *Artemisia*, ce dernier est largement distribué, surtout dans les régions semi arides. De nombreuses espèces de ce genre sont utilisées en médecine traditionnelle parce qu'elles renferment plusieurs molécules douées d'activités thérapeutiques, parmi les espèces les plus connues se trouve *Artemisia herba alba*. Cette plante largement utilisée pour traiter les troubles digestives, les crampes abdominales, la diarrhée, les brûlures, le diabète (Bouraoui, 2003),....etc.

Dans ce contexte s'inscrit le présent travail de recherche dont le but principal est d'étudier les activités antioxydantes et antibactérienne de l'extrait aqueux d'*Artemisia herba alba*.

La majorité des recherches ont étudié les huiles essentielles, alors que, à notre connaissance, l'extrait aqueux lyophilisé n'a jamais fait l'objet d'étude.

Notre travail a pour objectif d'extraire les molécules bioactives, avec la détermination de la concentration de certains groupes (polyphénols totaux, tanins, flavonoïdes), comme il vise à tester les activités biologiques : l'activité antioxydante et l'activité antibactérienne d'*Artemisia herba alba*.

Synthèse bibliographique

Chapitre I

Présentation de la plante d'Artemisia herba alba

I- GENERALITES

Connue depuis des millénaires, l'armoise blanche a été décrite par l'historien grec Xénophon au début du IV siècle avant J-C, dans les steppes de la mésopotamie (Francis joannes, 2001). Elle a été ensuite répertoriée en 1779 par le botaniste espagnol Ignacio Claudio de Asso y del Rio (IPNI). C'est une plante essentiellement fourragère, très appréciée par le bétail, elle présente une odeur caractéristique d'huile de thymol et un goût amer d'où son caractère astringent (Nabli, 1989).



Figure 01: *Artemisia herba alba* (Bouldjadj, 2009)

I-1- Origine

L'*Artemisia* est le nom de guerre des armoises, il provient de celui de la déesse grecque de la chasse Artémis, la diane des romains, patronne des vierges à cause des bienfaits de cette herbe. *Herba alba* signifie herbe blanche (Euro plus Med).

Plusieurs noms sont attribués à l'armoise blanche tels le thym des steppes, absinthe du désert. En Afrique du nord et en moyen orient, on l'appelle communément "Shih" ou "Chih".

I-2- Taxonomie et classification

L'espèce *Artemisia herba-alba* a été répertoriée en 1779 par le botaniste Ignacio Jordán Claudio de Assoy del Rio (INPI, 2014) comme il le montre le tableau suivant :

Tableau I: Classification de la plante d'*Artemisia herba alba* (INPI, 2014).

Règne	Plante
Embranchement	Angiospermes
Ordre	Astrerales
Famille	Asteraceae
Sous-famille	asteroideae
Tribu	Anthemideae
Sous-tribu	Artemisiinae
Genre	<i>Artemisia</i>

Nom binominal: *Artemisia herba-alba*.

Nom vernaculaires : Chih en arabe ; armoise blanche en français ; *Wormwood* en anglais.

I-3- Description botanique

Artemisia herba-alba est une plante herbacée, vivace, de couleur verdâtre-argenté, de 30-50 cm de hauteur avec des tiges ramifiées, rigides et dressées. Les feuilles sont petites, sessiles, pubescentes et à aspect argenté (Quezel et Santa, 1962), divisées en languettes fines, blanches et laineuses. Les fleurs sont groupées en grappes, à capitules très petites et ovoïdes de 1,5 à 3 mm de diamètre, de couleur jaune à rougeâtre (Bezza *et al.*, 2010). (Figure 02)

La croissance végétative de la plante a lieu à l'automne (feuilles de grande taille), puis dès la fin de l'hiver et au printemps (feuilles plus petites) (Akrouf, 2004).

Les racines se présentent sous forme d'une racine principale, ligneuse et épaisse, bien distincte des racines secondaires et qui s'enfonce dans le sol comme un pivot. La racine pénètre profondément jusqu'à 40 à 50 cm et ne se ramifie qu'à cette profondeur (Aidoud, 1983).

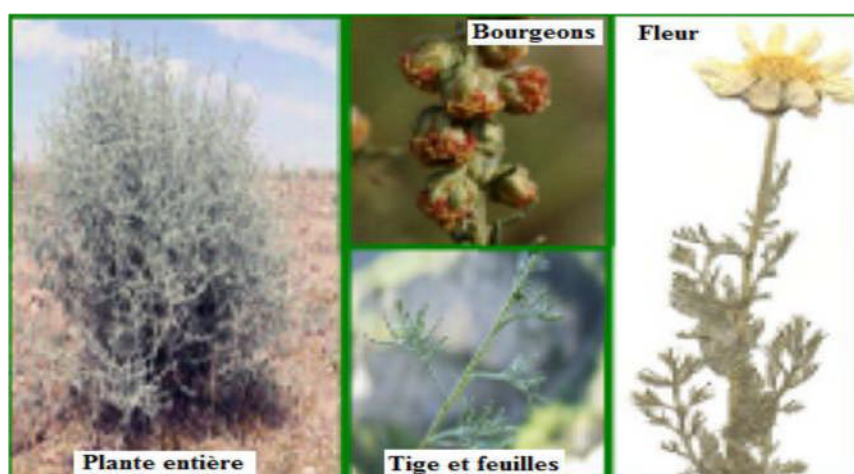


Figure 02: L'*Artemisia herba alba* de la région de Biskra (Bezza *et al.*, 2010).

I-4- Composition chimique

Plusieurs métabolites secondaires ont été isolés et identifiés de l'*Artemisia herba alba* dont les plus importants sont les sesquiterpènes lactones tels que les eudesmanolides et les germacranolides (Marco, 1989).

Les flavonoïdes détectés dans l'armoise montrent aussi une diversité structurale allant des flavonoïdes communs (flavones glycosides et flavonols) jusqu'aux flavonoïdes méthylés qui sont très inhabituel. Les flavonoïdes glycosides comprennent les *O-glycosides* tels que quercitine-3-glucoside et des flavones *C-glycosides* qui sont rares dans le genre *Artemisia*, ainsi que dans l'ensemble des Astéracée (Saleh *et al.*, 1987 ; Salah *et Jager.*, 2005).

En plus des sesquiterpènes lactones et des flavonoïdes l'analyse phytochimique a montré que la composition des huiles essentielles de l'*Artemisia herba alba* est riche en mono terpènes, tri terpènes pentacycliques, santonines, coumarines et tanins (Mohamed *et al.*, 2010).

I-5- Répartition géographique

L'*Artemisia herba alba* est une plante spontanée très répandue en Afrique du nord et au moyen orient, elle affectionne les climats secs et chauds, et existe sous forme de peuplements importants dans les zones désertiques (Hurabielle *et al.*, 1981). C'est une plante steppique des régions irano-touraniennes, prédominante dans les steppes d'Espagne ainsi que dans le désert de Sinäï (Segal *et al.*, 1987).

Au Maroc, l'*Artemisia herba alba* se rencontre à l'état spontané, il n'est pas rare de trouver des zones de plusieurs dizaines de kilomètres de rayon ou seule l'armoise blanche règne dans un paysage quasi-désertique. Le Maroc attache beaucoup d'importance à cette plante qui constitue un excellent moyen naturel de lutte contre l'érosion et la désertification (Bendjilal *et al.*, 1980).

En Algérie, l'*Artemisia herba alba*, connue sous le nom de « Chih » ou encore appelé semen-contra de barbarie, couvre près de six millions d'hectares dans les steppes, elle se présente sous forme de buissons blancs, laineux et espacés (Boutekjenet, 1987).

I-6- Ecologie de la plante

L'*Artemisia herba alba* existe dans les bioclimats allant du semi-aride jusqu'à saharien. Elle semble indifférente aux altitudes et peut vivre dans les régions d'hiver chaud à frais. Dans le sud, cette plante pousse sur les sols bruns steppiques de texture moyenne et en extrême sud sur les sols sableux. Elle résiste à la sécheresse, supporte le gypse et des niveaux de salinité modérément élevés (Nabli, 1989).

Elle se développe dans les steppes argileuses où les précipitations sont de l'ordre de 200mm/an. Son développement est lié à la nature du sol. En effet, il faut qu'il soit peu perméable, tassé et colmaté (Celles, 1980).

Accompagnée de l'alfa « *stippa tenassisima* », elle couvre souvent de très grandes superficies dans les hauts plateaux. Sa présence est plus fréquente en bordure des oueds et dans les dayas (dépression de la steppe à sol imperméable qui sont des secteurs plus ou moins humides) (Pouget, 1989).

I-7- Usage de la plante

I-7-1- Usage phyto-thérapeutique

Depuis longtemps, l'*Artemisia herba halba* a été reconnue par les populations pastorales et nomades pour ses vertus purgatives. On l'utilise notamment comme vermifuge chez les ovins (Nabli, 1989). Elle est employée par la population de Naguef pour soulager les maux gastro-intestinaux (Friedman *et al.*, 1986). En Tunisie, elle est utilisée pour les maladies digestives et pour le traitement antidiabétique (Bouraoui, 2003). *Artemisia herba alba* est utilisée comme anti diarrhée, contre les crampes abdominales, et pour curatif des blessures externes (Feuerstein *et al.*, 1986). Elle est utilisée contre le diabète et l'ictère (Marrif *et al.*, 1995). Elle est recommandée pour des désordres neurologiques (Salah *et al.*, 2005).

I-7-2- Usage alimentaire

En alimentation, l'*Artemisia herba halba* est considérée comme l'arôme de certaines boissons comme le thé ou le café (Bendjilali *et al.*, 1984). Néanmoins, son usage dans l'industrie alimentaire reste très limité à cause de la toxicité de la bêta thujone dont le taux ne doit pas dépasser 5mg/kg (Bendjilali *et al.*, 1984).

Chapitre II
Les métabolites secondaires
d'Artemisia herba alba

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées par les plantes autotrophe, qui sont divisés principalement en trois familles : les polyphénols, les terpènes, les alcaloïdes (Lutge *et al.*, 2002 ; Abderrazak *et Joël.*, 2007) .

Plusieurs métabolites secondaires ont été isolé à partir d'*Artemisia herba alba* Asso, dont les sesquiterpènes lactones (Mohamed *et al.*, 2010), les flavonoïdes (Kundan *et Anupam*, 2011), les tanins (Mohamed *et al.*, 2010) et en monoterpène, triterpènes pentacycliques , santonines, coumarines que l'analyse phytochimique de son l'huile essentielles a révélé (Kundan *et Anupam*, 2011) et tanins (Mohamed *et al.*, 2010).

II-1 Composés phénoliques

L'acide chlorogénique a été isolé à partie d'*Artemisia herba-alba*, au cours d'une enquête réalisée sur 49 espèces de plantes médicinales marocaines (Mouhajir *et al.*, 2001). Dans une autre enquête sur les principes actifs antiulcérogènes d'*Artemisia herba-alba*, huit polyphénols et composants connexes ont été isolés (Kim *et al.*, 2004).

II-1-1 Polyphénols

Les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux, caractérisés par la présence d'au moins d'un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle libre, ou engagé dans une autre fonction tels que : éther, ester, hétéroside...etc. (Bruneton, 1999 ; Lugasi *et al.*, 2003).

En effet les composés phénoliques, constituent le groupe le plus nombreux et le plus largement distribué dans le royaume des végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliques connus (Lugasi *et al.*, 2003).

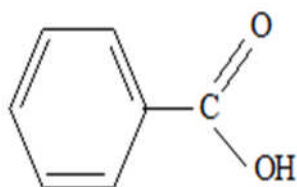
Les principales classes de composants phénoliques sont: les acides phénoliques (acide caféique, acide hydroxycinnamique, acide chlorogénique), les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols, les tanins, et les coumarines (King *et Young.*, 1999 ; Tapiero *et al.*, 2002). Les polyphénols sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs: racine, tiges, feuilles, fleurs, fruits (Boizot *et Charpentier.*, 2006).

II-1-1-1 Acides phénoliques

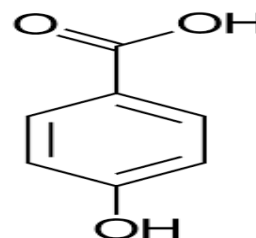
Ils appartiennent à deux groupes, acides hydroxybenzoïques ou acides hydroxycinnamiques (Bernal *et al.*, 2010).

• **Acides hydroxybenzoïques**

Dérivés de l'acide benzoïque avec une formule de base de type (C6-C1), existent fréquemment sous forme d'esters ou de glucosides et peuvent également être intégrés dans des structure complexes comme certains tanins (Bernal *et al.*, 2010).



Acide benzoïque

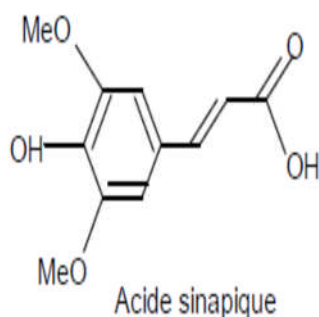


Acide p-hydroxybenzoïque

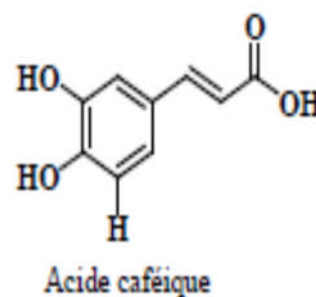
Figure 03: Exemples des dérivés d'acides hydroxybenzoïques.

• **Acides hydroxycinnamiques**

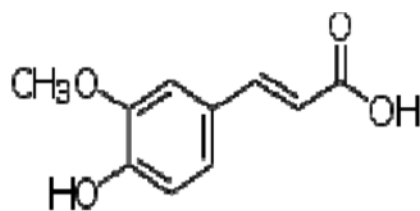
Dérive de l'acide cinnamique dont la structure de base (C6-C3). Les molécules de base de la série hydroxycinnamiques sont l'acide *p*-coumarique et ses isomères (acides *o*-et *m*coumarique) et les acides caféique, férulique et sinapique. Ces acides sont rarement présent à l'état libre et existent généralement sous forme d'ester (avec le glucose, l'acide quinique, l'acide tartrique ...) ou de glucosides (Pascale *et* Veronique, 2006).



Acide sinapique



Acide caféique



Acides férulique

Figure 04: Exemples des dérivés d'acides hydroxycinnamiques.

II-1-2 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés phénoliques naturels (Seyoum *et al.*, 2006), ils contribuent à la pigmentation des végétaux, souvent responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (Ghestem *et al.*, 2001 ; Bruneton, 19991). Certains d'entre eux sont synthétisés par la plante afin de lutter contre diverses parasitoses (Messai, 2011). On en dénombre près de 6400 structures identifiées (Harborne *et Williams.*, 2000).

Tous les flavonoïdes sont des dérivés benzo-y-pyrane (Skerget *et al.*, 2005). Leur structure de base est celle d'un diphenyl propane à 15 atomes de carbone (C6-C3-C6), constitué de deux noyaux aromatiques qui désignent les lettres A et B, reliés par un hétérocycle oxygéné, qui désigne la lettre C (Dacosta, 2003).

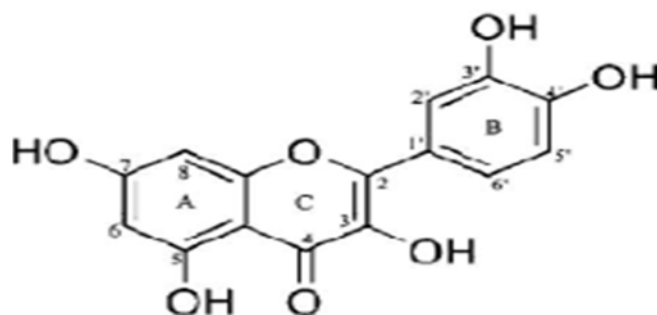
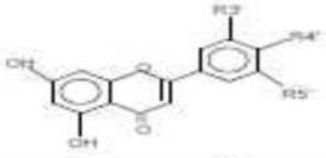
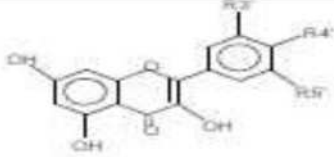
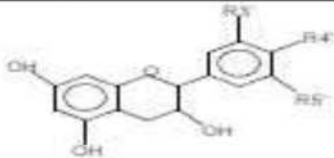
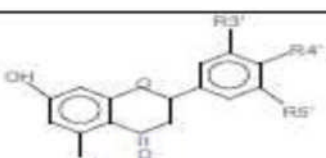
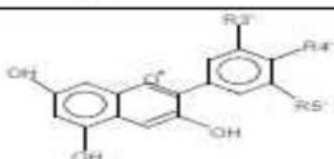
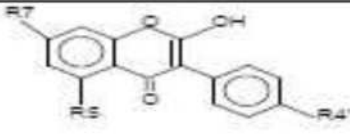


Figure 05: Structure de base des flavonoïdes.

II-1-2-1 Classification

Les flavonoïdes sont subdivisés en classes dont les plus importants sont : flavones, isoflavandiol, flavonols, flavandiols, aurones, chalcones, anthocyanins .

Tableau II: Principales classes des flavonoïdes (Narayana *et al.*, 2001).

Classes	Structures chimiques	R3'	R4'	R5'	Exemples
Flavones		H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	H	Lutéoline
		OH	OCH3	H	Diosmétine
Flavonols		H	OH	H	Kaempférol
		OH	OH	H	Quercétine
		OH	OH	OH	Myrecétine
Flavanols		OH	OH	H	Catéchine
Flavanones		H	OH	H	Narungénine
		OH	OH	H	Eriodictyol
Anthocyanidines		H	OH	H	Pelargonidine
		OH	OH	H	Cyanidine
		OH	OH	OH	Delphénidine
Isoflavones		R5	R7	R4'	
		OH	OH	OH	Genisteine
		H	O-Glu	OH	Daïdezine

Les flavonoïdes détectés dans l'armoise blanche montrent une diversité structurale, allant des flavonoïdes communs : flavones glycosides et flavonols jusqu'aux flavonoïdes méthylés qui sont très inhabituel. Les flavonoïdes glycosides comprennent les *O-glycosides* tels que quercitines-3-glucoside et des flavones *C-glycosides* qui sont rares dans le genre *Artemisia* et l'ensemble des astéracée (Saleh *et al.*, 1985 ; Saleh *et al.*, 1987). En Egypte, un total de huit flavonoïdes *O-* et *C-glycosides* ont été isolé et identifié à partir d'*Artemisia herba-alba* (Saleh *et al.*, 1987 ; Saleh *et al.*, 1985). Au Liban l'étude des parties aériennes

d'*Artemisia herba alba* a conduit à l'isolement de deux flavonoïdes: l'hispidulin et le cirsilineol (Salah *et jäger*, 2005).

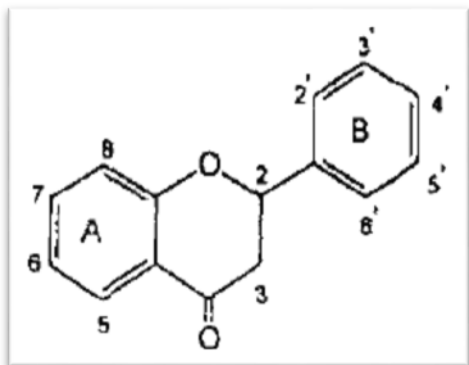


Figure 06: Structure de base des flavanones

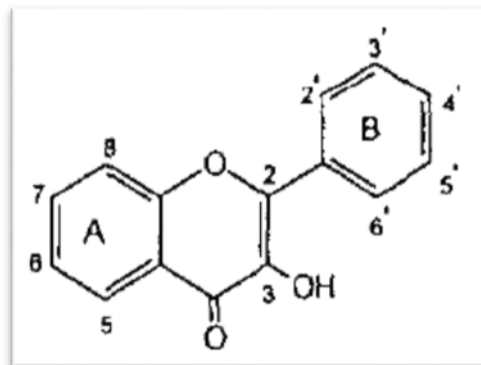


Figure 07: structure de base des flavonols.

II-1-3 Les tanins

Les tanins sont des substances polyphénoliques de structure variée, de saveur astringente ayant en commun la propriété de tanner la peau, cette aptitude est lié à leur propriété de se combiner aux protéines. Leur poids moléculaire est compris entre 500 et 3000 Da (Paris *et Hurabielle.*, 1981).

Les tanins sont très répandus dans le règne végétal, mais ils sont particulièrement abondants dans certaines familles comme les conifères, les Fagacée, les rosacée (Ghesterm *et al.*, 2001). Ils peuvent exister dans divers organes: l'écorce, les feuilles, les fruits, les racines et les graines (Khanbabae *et Ree.*, 2001).

II-1-3-1 Classification

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

II-1-3-1-1 Tanins hydrolysables

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

➤ **Tanins galliques (Gallo tanins)**

Les tanins galliques donnent par l'hydrolyse des oses et de l'acide gallique.

➤ **Tanins ellagiques (Ellagitanins)**

Les tanins ellagiques sont scindés par les enzymes en oses et en acide ellagique (Paris et Hurabielle., 1981).

II-1-3-1-2 Tanins condensés

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

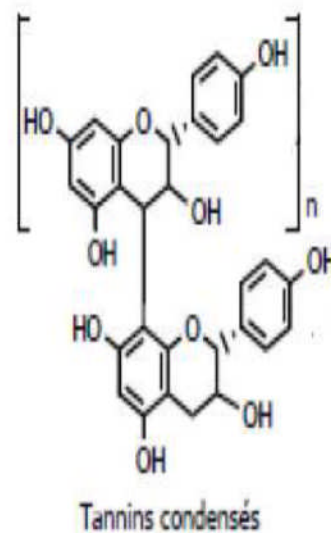
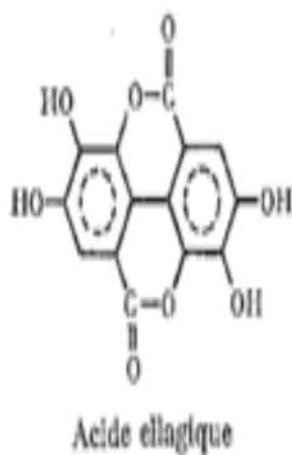
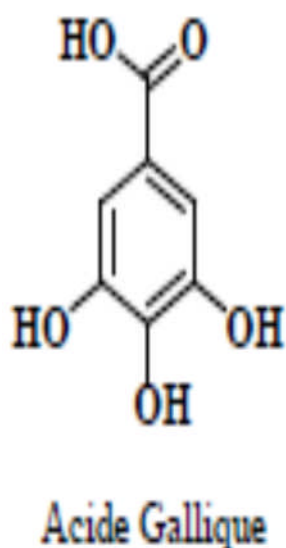


Figure 08: Exemples des quelques tanins.

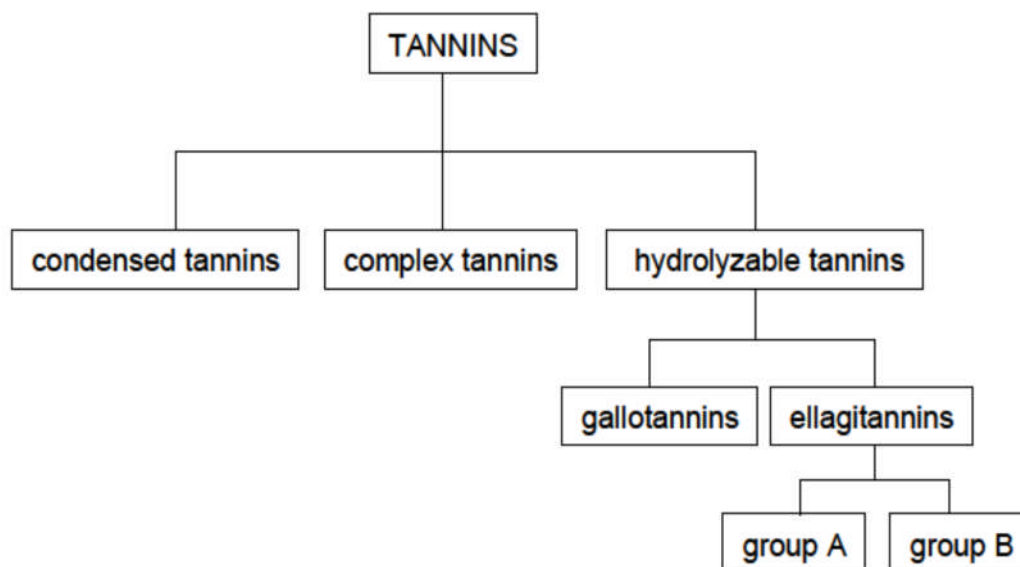


Figure 09: Classification des tanins (Wilfred et Ralph., 2006).

II-1-3-2 Les activités biologiques des tanins

Les activités biologiques des tanins sont principalement liées à leur capacité à former des complexes avec les macromolécules, en particulier les protéines. C'est pourquoi ils sont utilisés dans le traitement des aliments et la clarification des vins, des bières et des jus de fruits. Ils font également partie des formulations des agents de conservation du bois (Rira, 2006).

Plusieurs études suggèrent que la présence des tanins condensés à un seuil inférieur à 6% est avantageuse et induit une amélioration des performances animales : croissance et rendement en viande et en lait (Barry *et al.*, 1986).

La précipitation des protéines par les tanins participe également à l'activité antidiarrhéique, en protégeant les organes digestifs des attaques nuisibles. Elle contribue aussi à l'action antihémorragique (Makkar, 2003). En concentrations relativement faibles, les tanins stimulent l'activité des enzymes digestives et inhibent la mutagénicité de plusieurs agents cancérogènes. Cette action est en partie, attribuée à leur capacité à former des liaisons avec ces composés, ce mécanisme d'inhibition dépend du type de mutagènes. Une forte inhibition de la progression des tumeurs a été démontrée expérimentalement pour plusieurs types de tanins sur deux étapes de la cancérogenèse (Perchellet *et al.*, 1996).

II-2 Les sesquiterpènes lactones

Les sesquiterpènes lactones sont parmi les composés communément rencontrés dans les espèces *Artemisia* (Sanz *et al.*, 1990). Ils sont largement responsables de l'importance médicinale de ces plantes. Plusieurs sesquiterpènes lactones ont été identifiés dans les parties aériennes d'*Artemisia herba-alba* : les eudesmanolides et les germacranolides semblent être les types de lactones les plus abondants (Marco, 1989).

Au cours d'une enquête réalisée en Israël, plusieurs chémotypes différents d'*Artemisia herba-alba* ont été identifiés sur la base des différences dans leur constitution en sesquiterpènes lactones (Segal *et al.*, 1987). . D'autres études réalisées au Maroc (Marco *et al.*, 1994), Algérie (Vernin *et al.*, 1995) ont montré que le genre *Artemisia* est riche en sesquiterpènes.

II-3 L'huile essentielle

Au cours des dernières décennies, l'huile d'*Artemisia herba-alba*, appelée huile de *shih*, a été beaucoup étudiée, et une grande diversité dans la composition de l'huile extraite de plantes poussant dans des pays différents, et même dans des localités différentes du même pays a été mise en évidence (Salido *et al.*, 2004 ; Paolini *et al.*, 2010).

Dans la plupart des cas, il a été rapporté que l'huile d'*Artemisia herba-alba* contient principalement des monoterpénoïdes, principalement oxygénés, tels que le 1,8-cinéole (Feuerstein *et al.*, 1986), le chrysanthenone, le chrysanthenol (et son acétate), α et β -thuyone et le camphre (Feuerstein *et al.*, 1988).

En Algérie, des études sur la composition de l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* ont montré que le camphre, l' α / β -thujone, le 1,8-cinéole et les dérivés du chrysanthenyl sont les principaux composant (Vernin et Parkanyi, 2001 ; Vernin *et al.*, 1995 ; Vernin et Merad, 1994).

Dans d'autres études, le camphène (3%), le bornéol (3.6%), l'éther davana (8.8%), le davanone (36.1%) ont été les principaux composants (Dahmani-Hamzani et Baaliouamer, 2005). L'huile essentielle obtenue à partir des parties aériennes d'*Artemisia herba- alba* sauvage récoltées de M'sila-Algérie, contient principalement le camphre (19.4%), le trans-pinocarveol (16.9%), le chrysanthenone (15.8%). Selon Dob et Benabdelkader (2006), les monoterpénoïdes sont les principaux composants (86.1%), suivis par les monoterpènes irréguliers (3.1%).

II-3-1 Les Activités biologiques des huiles essentielles

II-3-1-1 les activités antimicrobiennes

L'activité antimicrobienne des HE est principalement due à leur composition chimique et en particulier à la nature de leur composé majoritaire. En effet, il est admis que l'activité antimicrobienne des HE se classe dans l'ordre décroissant suivant la nature de leur composés majoritaires (Franchomme, 1981 ; Lec *et al.*, 1971) : Phénols > Alcools > aldéhydes > Cétones > oxyde > esters > hydrocarbure . L'effet des composés quantitativement minoritaires n'est parfois pas négligeable (Rhayour, 2002).

II-3-1-2 Activité antivirale

Plus d'une dizaine d'huiles essentielles possèdent des propriétés antivirales. Les virus sont sensibles aux huiles essentielles surtout au phénol et au monoterpénol (Girard, 2010 ; Mayer, 2012). Une étude *in vitro* a montré l'effet antiviral de l'HE d'origan et du girofle sur le virus Type 1 de l'herpès simplex ainsi que sur le virus de la maladie de Newcastle (Siddiqui *et al.*, 1996).

II-3-1-3 activité antioxydante

Plusieurs publications ont rapporté que certaines l'huile essentielles ont une activités antioxydante plus importante que quelques antioxydants synthétiques (Hussain *et al.*, 2008, 2010). Cette efficacité antioxydante est due principalement à la présence des groupes hydroxyles dans leurs structures chimiques (Hussain, 2009).

Des études issues du Laboratoire de Recherche en Sciences Appliquées à l'Alimentation (RESALA) de l'INRS-IAF, ont montré que l'incorporation des huiles essentielles dans les aliments (viandes hachées, purées de fruits, yaourt ...) contribue à préserver ces aliments des phénomènes d'oxydation (Caillet *et Lacroix*, 2007).

II-3-1-4 activité anti-inflammatoire

Plusieurs maladies inflammatoires comme le rhumatisme, les allergies et l'arthrite sont soignées en milieu clinique en utilisant des huiles essentielles (Mebarki, 2010).

Chapitre III
Les activités biologiques
d'Artemisia herba alba

III-1 Les activités antimicrobiennes

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

Beaucoup de groupes de recherches ont étudié l'activité antimicrobienne des extraits de plantes médicinales telles que fenel (*Foeniculum vulgare*), peppermint (*Mentha piperita*), thyme (*Thymus vulgaris*), ils ont trouvé que ces extraits sont actifs non seulement contre les bactéries mais aussi contre les champignons, les levures et les virus (Jürgen *et al.*, 2009)

D'autres groupes de chercheurs ont franchi une étape plus loin, ils ont isolé et identifié les métabolites responsables de l'activité antimicrobienne des extraits de plantes, cette étape constitue une plateforme pour plusieurs implications incluant l'industrie pharmaceutique, la médecine alternative, et la thérapie naturelle (Huang *et al.*, 2008).

III-1-1 Activités antibactériennes

Il a été prouvé par des chercheurs israéliens en 1979 que l'huile essentielle de l'*Artemisia herba alba* est active contre quatre souches bactériennes : Gram+ (*staphylocoques* et *streptocoques*) et Gram- (*E.coli* et *Salmonella typhosa*) et ceci en inhibant leur croissance (activité bactériostatique).

Lors d'une étude menée par Khebri. (2011), *Artemisia herba alba* s'est montrée très active vis-à-vis de : *E.coli*, *Serratia.sp*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter* et *Haemophilus....*

III-1-2 Activités antifongiques

L'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* agit de façon active sur *Fusarium oxysporum* et *Rhizopus stolonifer*, le pourcentage d'inhibition dépasse 75 % ceci est dû à la présence de composés majoritaires tel a et -thujone dont l'activité antifongique confirmé par une étude réalisée par Pitarokili *et al*, (2003).

Tantaoui *et al.*, 1993 ; rapportent que l'huile essentielle d'*Artemisia heba alba* inhibe la reproduction asexuée du *Aspergillus niger*, *Penicillium italicum*, et *Zygorhynchus*.

III-2 Les activités antioxydantes

III-2-1 Le stress oxydatif

Le stress oxydatif est défini comme étant le déséquilibre entre la génération des espèces réactives de l'oxygène et la capacité du corps à neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs (Boyd *et al.*, 2003).

III-2-2 Les radicaux libres

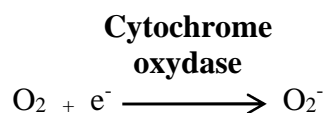
Un radical libre est définies comme toute molécule possédant un ou plusieurs électrons non appariés (Jacques *et* André., 2004), cette molécule est très instable et réagit rapidement avec d'autres composants, essayant de capturer l'électron nécessaire pour acquérir la stabilité, une réaction en chaine débute lorsqu'un radical libre attaque la molécule stable la plus proche en lui arrachant son électron, et la molécule attaquée devient elle-même un radical libre (Martinez-Cayuela, 1995).

III-2-3 Les espèces réactives de l'oxygène

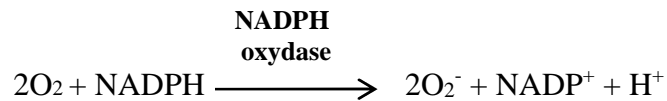
Parmi les espèces radicalaires les plus intéressantes se trouvent les espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui sont des radicaux libres qui dérivent de la molécule d'oxygène, par addition d'un électron. les principales espèces réactives de l'oxygène sont: le radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le radical hydroxyle ($\bullet OH$), le monoxyde d'azote (NO^{\bullet}), et aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le peroxynitrite ($ONOO^-$) (Jacques *et* André., 2004 ; Gutteridge, 1993).

III-2-3-1 Le radical superoxyde

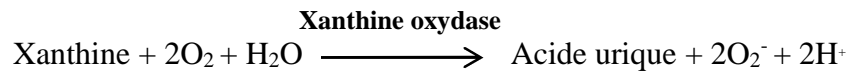
L'origine principale du radical superoxyde est sans conteste la chaîne respiratoire mitochondriale. En effet, ce système permet la production du radical superoxyde par l'addition d'un électron à l'oxygène moléculaire, cette réaction est catalysée par le cytochrome oxydase mitochondrial:



Le radical superoxyde peut également se former lors de la phagocytose grâce à la NADPH oxydase présente dans la membrane plasmique des phagocytes :



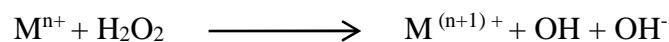
Une autre source possible est la xanthine oxydase. Cette enzyme catalyse l'oxydation de la xanthine en acide urique.



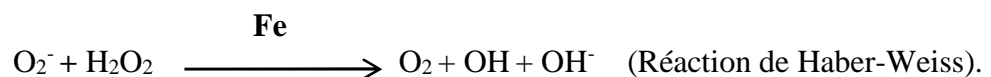
Le radical superoxyde est peu réactif, mais il entre comme agent oxydant dans la majorité des réactions

III-2-3-2 Le radical hydroxyle

Le radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$) est une espèce radicalaire hautement réactive. Il est principalement formé lors de réactions d'ions métalliques avec le peroxyde d'hydrogène, ces réactions sont décrites sous le nom de réactions de Fenton:

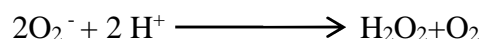


Le fer peut également catalyser la transformation de l'anion superoxyde en présence de peroxyde d'hydrogène avec production de radical hydroxyle selon la réaction dite Haber-Weiss. Cette réaction est relativement lente et moins courante que la précédente dans les tissus vivants (Jacques *et* André., 2004).



III-2-3-3 Le peroxyde d'hydrogène

Il se forme par une réaction de dismutation du radical superoxyde, catalysée par la superoxyde dismutase (SOD).



Le peroxyde d'hydrogène est moins réactif que l'anion superoxyde, mais il possède une capacité de diffusion importante (Jacques *et* André., 2004).

III-2-4 Les antioxydants

Les antioxydants sont l'ensemble des molécules susceptibles d'inhiber directement la production, de limiter la propagation ou de détruire les espèces réactives de l'oxygène. Ils peuvent agir en réduisant ou en dismutant ces espèces, en les piégeant pour former un composé stable, en séquestrant le fer libre ou en générant du glutathion (Favier, 2003).

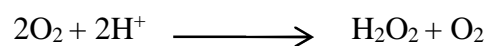
On distingue au niveau des cellules deux lignes de défense inégalement puissantes pour détoxifier la cellule:

III-2-4-1 Les antioxydants endogènes

L'organisme humain possède un système enzymatique, constitué principalement de trois enzymes: la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase (GPx) (Avisar *et al.*, 1989). Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène, conduisant finalement à la formation d'eau et d'oxygène moléculaire (Marfak, 2003).

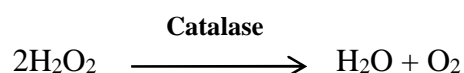
➤ **La superoxyde dismutase**

La superoxyde dismutase (SOD), est une enzyme qui élimine l'anion superoxyde par une réaction de dismutation, elle produit de l'oxygène et du peroxyde d'hydrogène. Cette enzyme existe sous deux formes : une cytoplasmique nécessite comme cofacteur les ions de cuivre et de zinc (CuZnSOD) et l'autre mitochondriale utilise le manganèse comme cofacteur (MnSOD) (Jacques *et André.*, 2004).



➤ **La catalase**

Le peroxyde d'hydrogène produit par la réaction de dismutation peut subir une réaction de Fenton. Il ne faut pas donc qu'il s'accumule, c'est le rôle de la catalase, elle transforme deux molécules de peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène qui sont des composés stables (Jacques *et André.*, 2004).



➤ **La glutathion peroxydase**

La glutathion peroxydase est une enzyme qui constitue l'un des plus importants systèmes enzymatiques de protection car elle est capable non seulement de détoxifier le

peroxyde d'hydrogène, mais aussi d'autres hydroperoxydes résultant de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras (Ganther, 1999).

La glutathion peroxydase se trouve dans le cytoplasme et dans les mitochondries, elle nécessite la présence de deux cofacteurs importants: le glutathion réduit et le sélénium.

En présence de deux molécules de glutathion sous forme réduites, la glutathion peroxydase catalyse la transformation de peroxyde d'hydrogène en deux molécules d'eau.

Au fur et à mesure de sa consommation par la glutathion peroxydase, le glutathion doit être régénéré, cela est rendu possible par une glutathion réductase qui consomme une molécule de NADPH fourni par la voie des pentoses phosphates (Jacques *et* André., 2004).

➤ **Les chélateurs de métaux**

Plusieurs protéines qui circulent dans le sérum peuvent prendre en charge des ions métalliques libres qui sont potentiellement toxiques, il s'agit de la transferrine et de la lactoferrine pour le fer et la céruléoplasmine pour le cuivre. Elles agissent comme des chélateurs et maintiennent les ions métalliques sous forme inactive par rapport à la combinaison possible avec le peroxyde d'hydrogène (Jacques *et* André., 2004).

III-2-4-2 Les antioxydants exogènes

De nombreuses molécules issues de notre alimentation : vitamines, nutriments, composés naturels,...etc. sont considérés comme des antioxydants. Notons à titre d'exemples, les plus courants:

III-2-4-2-1 Les vitamines

➤ **La vitamine E**

La vitamine E ou α -tocophérol, est un antioxydant liposoluble, elle se localise entre les chaînes d'acides gras des phospholipides qui constituent les membranes et les lipoprotéines. Le rôle essentiel de la vitamine E est de capter les radicaux peroxydes lipidiques RO₂ qui propagent les chaînes de peroxydation. La partie active de la molécule étant la fonction phénol réductrice. Celle-ci perd facilement un atome d'hydrogène et se transforme en radical α -tocophéryle, tandis que le radical peroxyde est réduit en une molécule d'hydroperoxyde. De plus, l' α -tocophérol capte les radicaux superoxydes (sous leur forme protonée HO₂[·]), les radicaux hydroxyles ·OH, ainsi que l'oxygène singulet O₂.

Bien que la concentration d' α -tocophérol soit relativement faible *in vivo*, le recyclage de ce dernier par des systèmes réducteurs dont le plus important est l'ascorbate, lui permet de jouer son rôle d'antioxydant à plusieurs reprises (Gardès-Albert *et al.*, 2003).

➤ La vitamine C

La vitamine C ou acide ascorbique est une vitamine hydrosoluble. L'ascorbate est un très bon capteur de radicaux libres oxygénés puisqu'il réagit non seulement avec les radicaux hydroxyles $\cdot\text{OH}$, mais aussi avec les radicaux superoxydes $\text{O}_2\cdot^-$. En outre, l'ascorbate capte les radicaux peroxydes $\text{RO}_2\cdot$. En réagissant avec ces diversoxyradicaux, l'ascorbate est oxydé en radical ascorbyle ($\text{Asc}\cdot^-$) qui est relativement inerte vis-à-vis des matériaux biologiques.

L'ascorbate possède une propriété importante qui est la réparation possible de deux autres antioxydants, le glutathion et l' α -tocophérol à partir de leurs formes radicalaires. Il est recyclé, tout au moins en partie, par dismutation du radical ascorbyle (Gardès-Albert *et al.*, 2003).

III-2-4-2-2 Antioxydants d'origine végétale

Les caroténoïdes et les polyphénols constituent de vastes familles de composés (plusieurs centaines) parmi lesquels se trouvent le β -carotène, l'acide caféique et la quercétine. Les caroténoïdes et les polyphénols sont généralement de bons capteurs de radicaux hydroxyles $\cdot\text{OH}$ et peroxydes $\text{RO}_2\cdot$. Ils sont donc susceptibles d'inhiber les chaînes de peroxydation lipidique, mais d'une manière moins efficace que celle de l' α -tocophérol. En outre, les caroténoïdes ont un rôle spécifique de capteur d'oxygène singulet O_2 , ce qui leur permet d'exercer une protection vis-à-vis des dommages induits par les rayons ultraviolets de la lumière solaire (Gardès-Albert *et al.*, 2003).

III-2-5 Les maladies liées au stress oxydatif

En faisant apparaître des molécules biologiques anormales et en surexprimant certains gènes, le stress oxydatif sera la principale cause initiale de plusieurs maladies: cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, œdème pulmonaire, vieillissement accéléré, Alzheimer, Parkinson, infections intestinales, rhumatisme, l'athérosclérose, le diabète (Atawodi, 2005 ; Georgetti *et al.*, 2003).

III-2-6 Autres activités

Des effets hypoglycémians, semblables à ceux d'*Artemisia scoparia*, avec une réduction consistante du niveau du glucose sanguin et présentant un minimum d'effets secondaires indésirables ont été démontrés après administration orales des extraits aqueux d'*Artemisia herba alba* (Alkhazraji *et al.*, 1993).

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

Ce travail est une contribution à l'étude phytochimique de l'extrait aqueux d'*Artemisia herba alba*, suivie d'une évaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne contre huit souches bactériennes dont deux sont pathogènes multi résistantes qui est réalisé au niveau de laboratoire de recherche de microbiologie appliqué de l'Université MOULOUD MAMMARI de Tizi-Ouzou.

I- Matériel et méthodes

I-1 Matériel

I-1-1 Matériel végétal

La plante *Artemisia herba alba* a été récoltée le matin le : 22/12/2015, dans un climat hyper aride de la région d'Assekrem de la wilaya de Tamanrasset (Algérie) (voir annexe 1), située à 2710 m d'altitude.



Figure 10: Photos de la partie aérienne d'*Artemisia herba alba* récoltée (Assekrem, Tamanrasset) (3264× 1836).

Matériel et méthodes

I-1-2 Matériel de laboratoire

I-1-2-1 Les différents produits chimiques et milieux de culture utilisés

Tableaux III : Produits chimiques et milieux de culture utilisés.

		Utilisations
Solvants	Méthanol	Dosage des flavonoïdes
Réactifs	1-1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)	Activité antioxydante
	Folin-Ciocalteu	Dosage des polyphénols totaux
	Trichlorure d'aluminium (AlCl ₃)	Dosage des flavonoïdes
	Folin-Denis	Dosage des tanins
	Acide ascorbique	Antioxydant standard
	Acide gallique	Polyphénol standard
	Quercétine	Polyphénol standard
	Acide tannique	Polyphénol standard
	Réactif de stiasny	Screening phytochimique
Sels	Chlorure de Sodium (NaCl)	Préparation de l'eau physiologique
Milieux de culture	Gélose Désoxycholate	Identification et purification des souches bactériennes
	Gélose chapman	
	VRBL	
	VRBG	
	Gélose à ADN	
	Milieu SS	
	Milieu Mueller- Hinton (MH)	Antibiogramme
	Bouillon Nutitif/Gélose PCA	Repiquage des souches bactériennes

Matériel et méthodes

• Autre produits

- ✓ H₂O₂
- ✓ Disques d'oxydase
- ✓ Plasma
- ✓ Galerie API 20E

I-1-2-2 Souches bactériennes utilisées

Les souches bactériennes utilisées sont des souches de référence appartenant à l'American Type Culture Collection (ATCC) et des souches pathogènes et virulentes dont deux sont multi résistantes du laboratoire de microbiologie (tableau IV). Elles sont réactivées à 37 °C par repiquage sur milieux : gélose PCA et bouillons nutritif pendant 18h.

Tableau IV: Les souches bactériennes utilisées et leurs provenances.

Souches bactériennes	Provenance	Gram
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Laboratoire de microbiologie de la FSBSA de Tizi Ouzou	Gram ⁻
<i>Escherichia coli</i>	Laboratoire de microbiologie du CHU de Tizi Ouzou	Gram ⁻
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Laboratoire de microbiologie de la FSBSA de Tizi Ouzou	Gram ⁺
<i>Salmonella</i>	Laboratoire de microbiologie du CHU de Tizi Ouzou	Gram ⁻
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 4352	Laboratoire de microbiologie de la FSBSA de Tizi Ouzou	Gram ⁻
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 825 (multi résistante)	Laboratoire de microbiologie du CHU de Tizi Ouzou	Gram ⁻
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 1766 (multi résistante)	Laboratoire de microbiologie du CHU de Tizi Ouzou	Gram ⁻
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	Laboratoire de microbiologie de la FSBSA de Tizi Ouzou	Gram ⁺

I-1-2-3 Antibiotiques utilisés

Tableau V: Les antibiotiques utilisés comme témoins positifs (anonyme, 2011).

	Nom	Abréviation	Dose
Antibiotiques	Cefazoline	CZ	30µg/disque
	Amoxicilline	AMX-AX-AM	25µg/disque
	Trimethoprim+Sulfamethoxazole	SXT	25µg/disque

I-2 Méthodes

I-2-1 Préparation de l'extrait aqueux d'*Artemisia herba alba*

Après la récolte, le matériel végétal est débarrassé des débris. Les feuilles de la plante sont ensuite isolées et séchées à l'air libre et à l'abri de la lumière pendant trois semaines, puis broyées et conservées dans un flacon en verre et maintenues à l'abri de la lumière et de l'humidité pour des analyses ultérieures.

Un extrait aqueux est préparé par macération dans de l'eau distillé à raison 10 % (10g de poudre des feuilles dissous dans 100ml d'eau distillée) (Salhi, 2012), à une température ambiante et à l'abri de la lumière sous agitation douce pendant 24 heures. Le mélange est ensuite filtré à l'aide de papier wattman pour avoir un filtrat (voir annexe 3), puis ce dernier va être congelé pendant une nuit. Ensuite une lyophilisation est réalisée pour avoir l'extrait sec qui va être conservé dans des tubes ECBU au réfrigérateur pour des analyses ultérieurs comme le montre la figure ci-après :

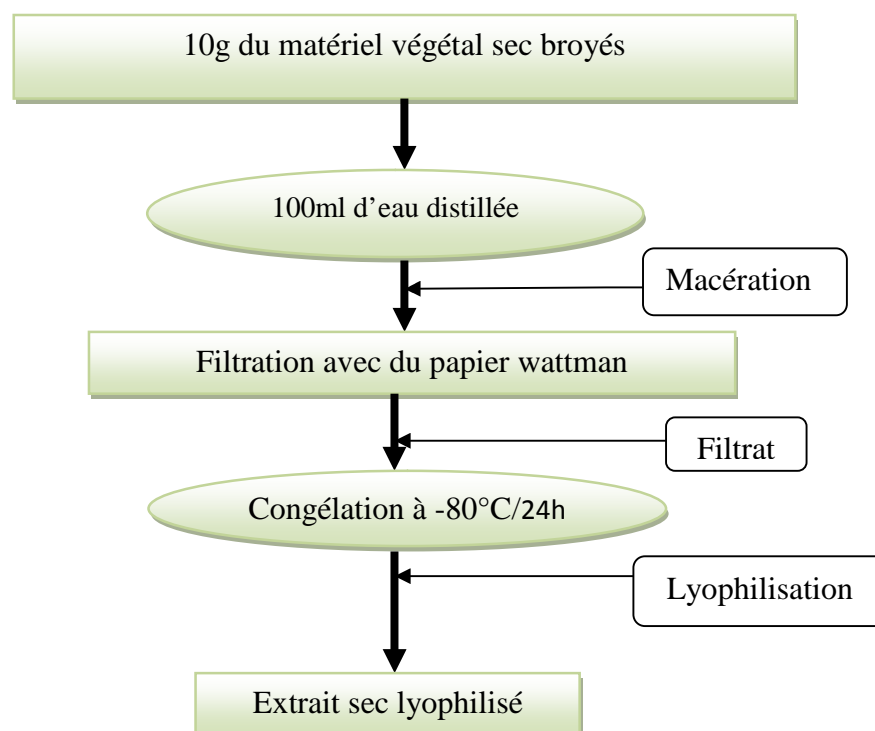


Figure 11: Schéma du protocole d'extraction de l'*Artemisia herba alba* selon le protocole de Salhi (2012) modifié.

I-2-2 Détermination du rendement d'extraction

Le rendement désigne la masse de l'extrait déterminée après évaporation du solvant, il est exprimé en pourcentage par rapport à la masse initiale de la plante soumise à l'extraction selon l'équation suivante décrite par (Mahmoudi *et al.*, 2013) :

$$R (\%) = (M_{\text{ext}} / M_{\text{éch}}) \times 100$$

R est le rendement en % ;

M ext est la masse de l'extrait après évaporation en mg ;

M éch est la masse de la matière sèche végétale en mg.

I-2-3 Détermination de la concentration maximale de l'extrait aqueux

C'est le seuil de saturation de l'extrait dans de l'eau distillé stérile qui est obtenus à partir d'une concentration de 0.2g/ml jusqu'à avoir un extrait qui ne peut plus être pipeté par la micropipette (aspect pâteux). Ce dernier a une concentration de 0.8g/ml.

I-2-4 Analyses quantitatives de l'extrait aqueux

I-2-4-1 Dosage des polyphénols totaux

➤ Principe

La méthode de dosage des polyphénols totaux repose sur l'oxydation des cycles phénoliques (Lhuillery, 2006). Le réactif utilisé est un mélange de phosphomolybdate et tungstate de sodium de couleur jaune, qui est réduit lors de l'oxydation de ces composés phénolique en milieu alcalin en un chromogène de couleur bleu.

La coloration produite est proportionnelle à la quantité des polyphénols totaux, qui est estimé par spectrophotométrie UV à une longueur d'onde de 760 nm. (Ghazi *et* Sahraoui, 2005).

➤ Mode opératoire

La teneur en polyphénols totaux de notre extrait aqueux a été déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1965). Des dilutions convenables de l'extrait aqueux sont, ainsi qu'une gamme d'étalon.

- **Préparation des solutions**

- Le réactif de Folin (10 fois dilué) ;
- Solution de carbonate de sodium 7,5%.

- **Préparation de la gamme étalon**

La gamme étalon est obtenue en utilisant l'acide gallique comme standard. À partir de la solution mère (SM) 0,01g /ml, on prépare des dilutions allant de 10 à 100mg/ml selon le tableau suivant :

Tableau VI: Préparation des dilutions d'acide gallique

Concentration mg/ml	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Volume SM (µl)	0	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000
Volume E.D (µl)	1000	900	800	700	600	500	400	300	200	100	0

Ensuite chaque dilution (dilution d'acide gallique et de l'extrait aqueux) est traitée selon le protocole décrit par la figure ci-dessous :

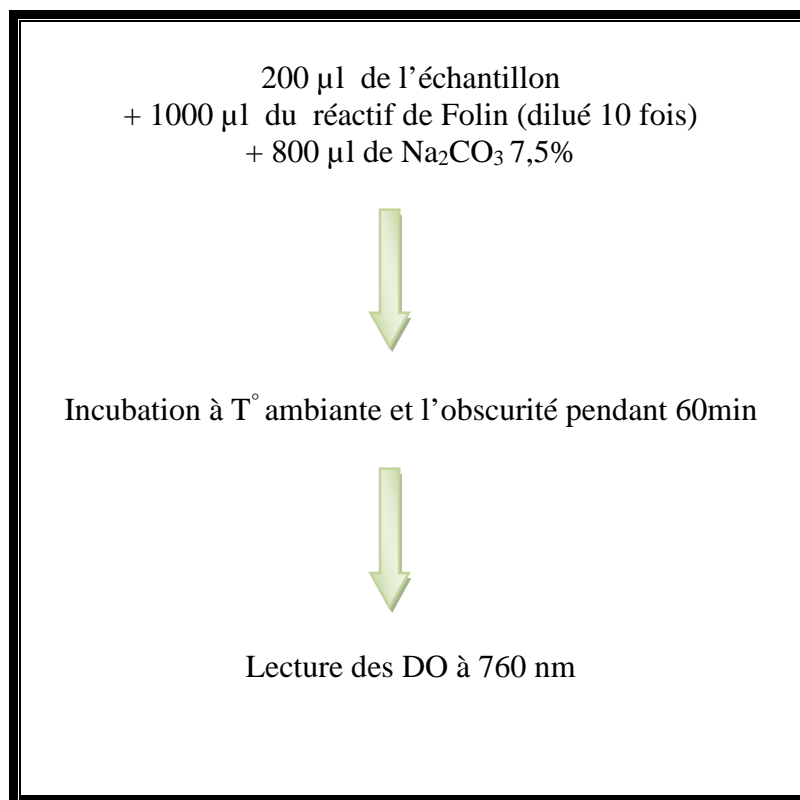


Figure 12: Protocole de dosage des polyphénols totaux (Singleton *et al.*, 1965).

➤ Expression des résultats

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique (AG). Elle est exprimée en mg équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/g de matière sèche « MS ») selon l'équation suivante :

$$T_{pt} = C \cdot V / M$$

T_{pt} : Teneur en polyphénols totaux (mg EAG/g d'extrait sec de la plante) ;

C : Concentration de l'extrait équivalente à l'acide gallique, obtenue à partir de la courbe d'étalonnage (mg/ml) ;

V : Volume de l'extrait (ml) ;

M : Poids sec de l'extrait de la plante (g).

I-2-4-2 Dosage des flavonoïdes

➤ Principe

Les flavonoïdes donnent avec le chlorure d'aluminium des complexes de couleur jaune, coloration dont l'intensité est mesurable à un spectrophotomètre à UV (Mbye Dieng, 2007).

➤ Mode opératoire

La teneur en flavonoïde de notre extrait aqueux a été déterminée en utilisant la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium (Yun *et al.*, 2009). Des dilutions convenables de l'extrait aqueux sont préparées, ainsi qu'une gamme d'étalon.

• Préparation de la gamme étalon

La gamme étalon est obtenue en utilisant la quercétine comme standard de calibration. À partir de la solution mère (SM) 0,2mg/ml de méthanol, on prépare des dilutions allant de 0,02 à 0,12mg/ml selon le tableau suivant :

Tableau VII: Préparation des dilutions de la quercétine.

Concentration mg/ml	0	0,02	0,04	0,06	0,08	0,1	0,12
Volume SM (µl)	0	200	400	600	800	1000	1200
Volume méthanol (µl)	2000	1800	1600	1400	1200	1000	800

Chaque dilution (dilution de la quercétine et l'extrait aqueux) est traitée selon le protocole décrit par la figure ci-dessous :

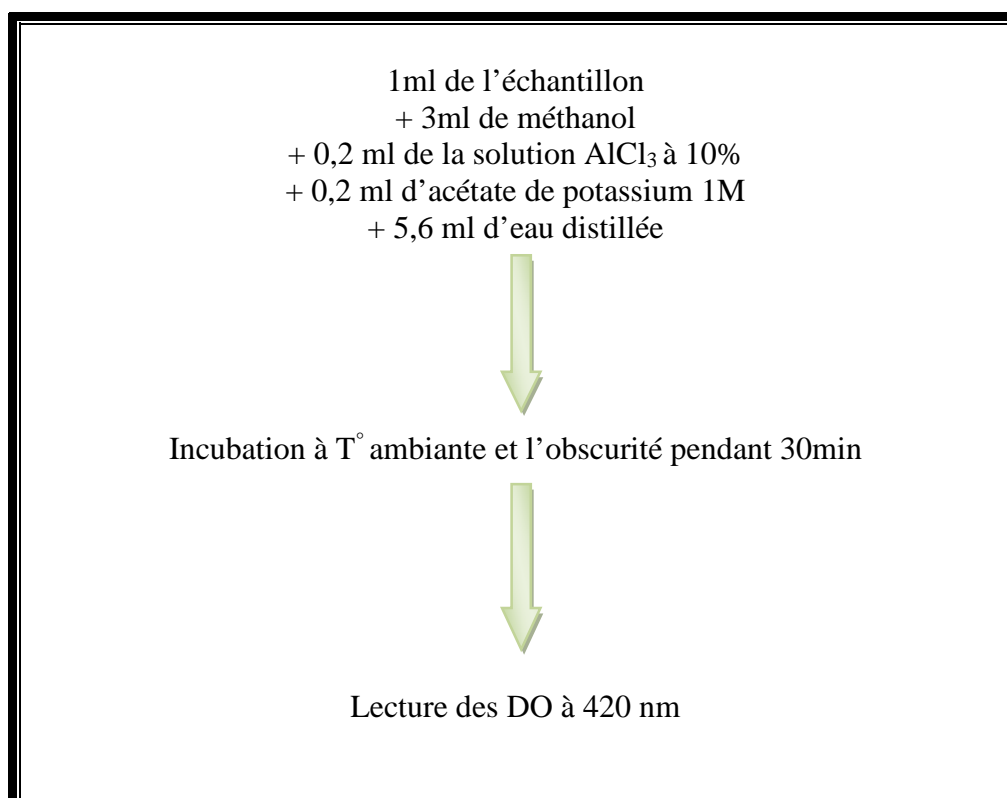


Figure 13 : Protocole de dosage des flavonoïdes (Yun *et al.*, 2009).

➤ Expression des résultats

La concentration des flavonoïdes est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec la quercétine. Elle est exprimée en mg équivalent de quercétine par gramme de matière sèche (mg EQ/g de matière sèche « MS ») selon l'équation suivante :

$$T_f = C \cdot V / M$$

T_f : Teneur en flavonoïdes (mg EQ/g d'extrait sec de la plante) ;

C : Concentration de l'extrait équivalente à la quercétine, obtenue à partir de la courbe d'étalonnage (mg/ml) ;

V : Volume de l'extrait (ml) ;

M : Poids sec de l'extrait de la plante (g).

I-2-5- Mise en évidence et dosage des tanins

I-2-5-1 Screening phytochimique des tanins

La caractérisation de tanin présente dans notre extrait a été déterminée par la technique décrite par Bekro *et al*, (2007).

La recherche des tannins catéchique s'est réalisée à partir du réactif de Stiasny. Cinq (5) ml de notre extrait a été évaporés à sec. Après ajout de 15ml du réactif de Stiasny au résidu, le mélange a été maintenu au bain-marie à 80°C pendant 30min. L'observation d'un précipité en gros flocons a caractérisé les tanins catéchiques.

Pour les tanins galliques, nous avons filtré la solution précédente. Le filtrat est recueilli et saturé d'acétate de sodium. L'addition de 3 gouttes de FeCl₃ provoquerait l'apparition d'une coloration bleu-noir intense, signe de la présence des tanins galliques.

I-2-5-2 Dosage des tanins

➤ Principe

La technique de dosage des tanins condensés est basé sur la réduction de l'acide phosphomolybdique et tungstique en milieu alcalin, en présence de tanins pour donner une coloration bleue dont l'intensité est mesurée à 760 nm.

➤ Mode opératoire

Les tanins sont dosés selon la méthode colorimétrique de Folin Denis décrite par Joslyn, 1970 modifiée. Des dilutions convenables de l'extrait aqueux sont préparées, ainsi qu'une gamme d'étalon.

- **Préparation des différentes solutions**

- La solution saturée de CO₃Na₂.

- **Préparation de la gamme étalon**

La gamme étalon est obtenue en utilisant l'acide tannique comme standard de calibration. À partir de la solution mère (SM) 1mg/ml d'eau distillée, on prépare des dilutions allant de 0,5 à 1mg/ml selon le tableau suivant :

Matériel et méthodes

Tableau VIII: Préparation des dilutions de l'acide tannique

Concentration mg/ml	0	1	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5
Volume SM (µl)	0	2000	1800	1600	1400	1200	1000
Volume E.D (µl)	2000	0	200	400	600	800	1000

Chaque dilution (dilution d'acide tannique et l'extrait aqueux) est traitée selon le protocole décrit par la figure ci-dessous :

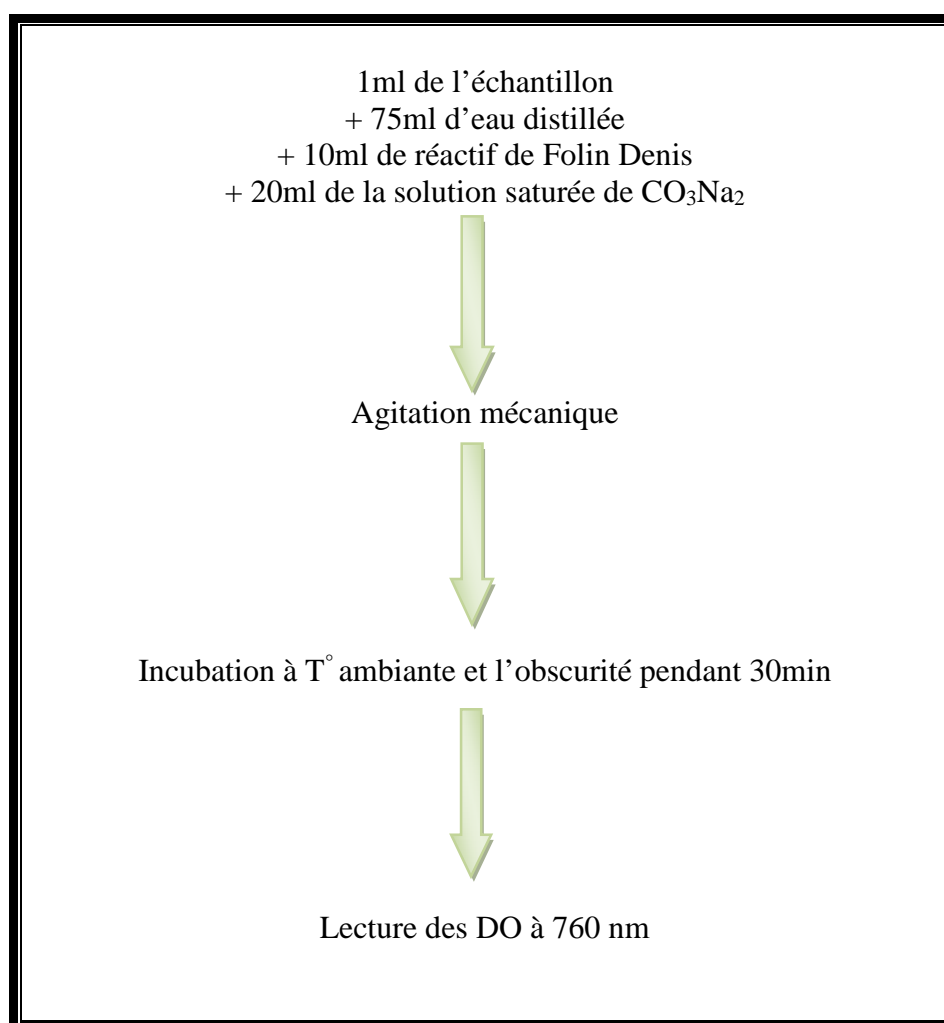


Figure 14: Protocole de dosage des tannins (Joslyn, 1970) modifié.

➤ Expression des résultats

La concentration des tanins condensés est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide tannique (AT). Elle est exprimée en mg

équivalent d'acide tannique par gramme de matière sèche (mg EAT/g de matière sèche « MS ») selon l'équation suivante :

$$T_t = C \cdot V / M$$

T_t: Teneur en tanins (mg EAT/g d'extrait sec de la plante) ;

C : Concentration de l'extrait équivalente à l'acide tannique, obtenue à partir de la courbe d'étalonnage (mg/ml) ;

V : Volume de l'extrait (ml) ;

M : Poids sec de l'extrait de la plante (g).

I-2-6 Tests des activités biologiques

I-2-6-1 Test de l'activité antioxydante

• Mise en évidence de l'activité antioxydante

Le pouvoir antioxydant de notre extrait aqueux a été testé en employant deux méthodes :

- ❖ Test de piégeage du radical libre DPPH. (C₁₈H₁₂N₅O₆) qui est fréquemment utilisée pour mesurer le pouvoir antioxydant des produits naturels et synthétiques (Obame *et al.*, 2007).
- ❖ Test de la réduction du fer FRAP qui est souvent employée pour étudier la capacité d'une substance à donner des électrons. Cette propriété constitue un important mécanisme de l'action antioxydante (Ebrahimzadeh *et al.*, 2008).

I-2-6-1-1 Test de piégeage du radical libre DPPH

➤ principe

Le principe est fondé sur le pouvoir des antioxydants qui jouent le rôle des piègeurs de radicaux libres. En présence de ces antioxydants : soit synthétique ou naturels (dans notre cas l'extrait aqueux de notre plante), le radical libre DPPH (2,2 diphényl 1 picryl hydrazyl), qui est caractérisé par sa couleur violette, se réduit en 2,2diphényl 1 picryl hydrazine de couleur jaune (Maataoui *et al.*, 2006). On peut résumer la réaction par le schéma représenté dans la figure suivante :

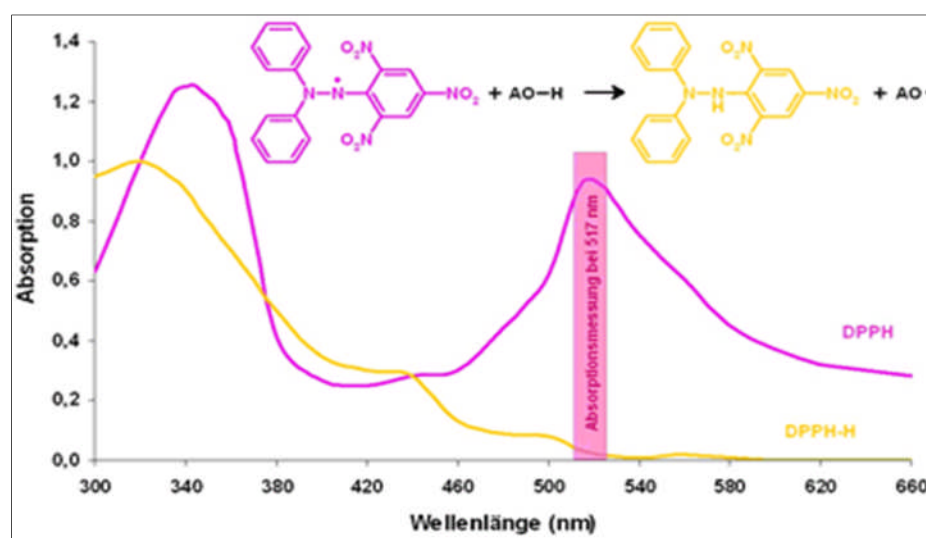


Figure 15: Schéma de transformation du DPPH de sa forme active à celle inactive (Matkowski *et al.*, 2008).

➤ Mode opératoire

Le test antioxydant a été réalisé selon la méthode décrite par Sanchez-Moreno *et al.* (1998). Des dilutions convenables de l'extrait aqueux sont préparées, ainsi qu'un contrôle positif. Un contrôle négatif a été préparé à partir d'une solution méthanolique du DPPH, la lecture de l'absorbance se fait à 515 nm contre un blanc.

Le contrôle positif est présenté par une solution d'acide ascorbique comme un antioxydant standard. A partir de la solution mère de la vitamine C 5mg/ml, on prépare des dilutions allant de 0,125 à 5mg/ml comme le montre le tableau suivant:

Tableau IX : Préparation des dilutions de l'acide ascorbique.

Concentrations mg/ml	0,125	0,5	0,75	1	2	4	5
Quantité en vitamine C (µl)	25	100	150	200	400	800	1000
Quantité en méthanol (µl)	975	900	850	800	600	200	0

Ensuite chaque dilution (du contrôle positif et de l'extrait aqueux) est traitée selon un protocole décrit par la figure ci-dessous :

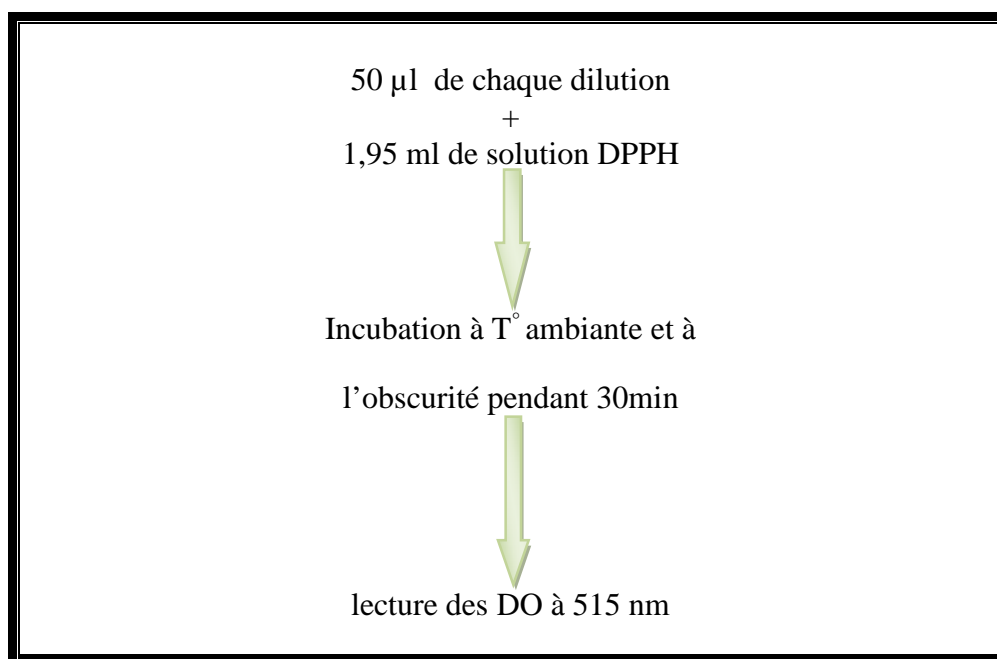


Figure 16: Protocole de piégeage du radical libre DPPH (Sanchez-Moreno *et al.*, 1998).

➤ Expressions des résultats

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition (I%) en utilisant la formule suivante :

$$I\% = [(Abs_{\text{contrôle}} - Abs_{\text{échantillon}}) / Abs_{\text{contrôle}}] \times 100$$

Abs_{contrôle} : Absorbance du contrôle négatif à 515 nm.

Abs_{échantillon} : Absorbance de l'échantillon à 515 nm.

I-2-6-1-2 Test de la réduction du fer FRAP

➤ Principe

Le pouvoir réducteur est basé sur la transformation de Fe³⁺ présent dans le complexe K₃Fe(CN)₆ en Fe²⁺ en présence d'un antioxydant qui a le pouvoir de céder des électrons. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des composés testés.

➤ Mode opératoire

L'activité réductrice du fer de notre extrait aqueux est déterminée selon la méthode décrite par Oyaizu (1986).

Des dilutions convenables de l'extrait aqueux sont préparées, ainsi qu'une gamme d'étalon.

• Préparation des différentes solutions du protocole

Les différentes solutions préparées :

- Tampon phosphate (Ph 6,6) ;
- Ferrocyanure de potassium ($K_3Fe(CN)_6$) à 1% ;
- Acide trichloracétique (10%) ;
- Chlorure de fer ($FeCl_3$) à 0,1%.

• Préparation de la gamme étalon

L'acide ascorbique est utilisé comme un antioxydant standard. À partir de la solution mère d'acide ascorbique 0,1mg/ml, on prépare des dilutions allant de 0,01 à 0,1mg/ml selon le tableau ci-dessous :

Tableau X: Préparation des dilutions de l'acide ascorbique.

Concentrations (mg/ml)	0	0,01	0,025	0,05	0,075	0,1
Quantité en vitamine C (μ l)	0	100	250	500	750	1000
Quantité en eau distillée (μ l)	1000	900	750	500	250	0

Ensuite chaque dilution (d'acide ascorbique et d'extrait aqueux) est traitée selon le protocole décrit par la figure ci-dessous :

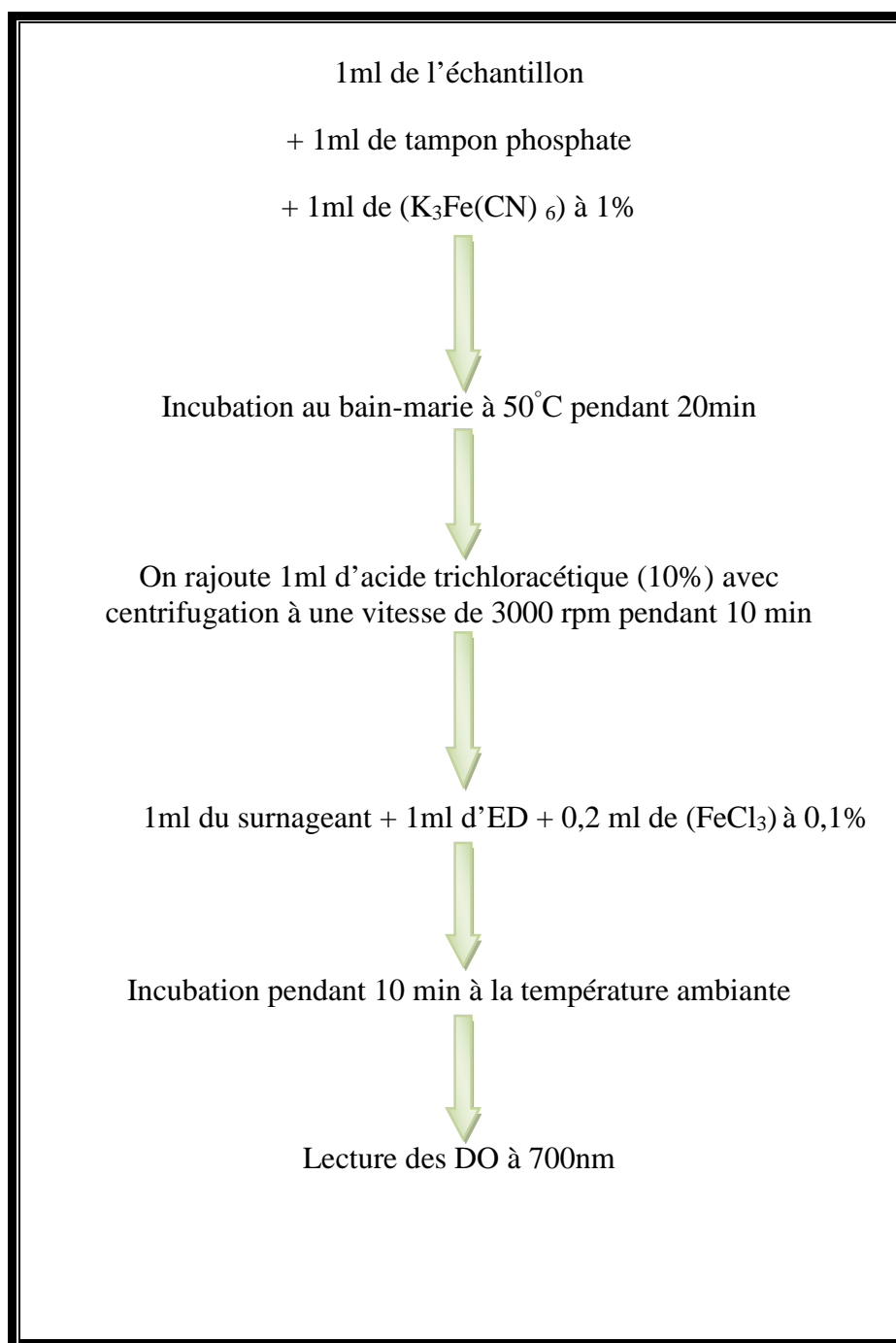


Figure 17: Protocole du test de la réduction de fer (Oyaizu, 1986).

➤ **Lecture des résultats**

L'augmentation de l'absorbance dans le milieu réactionnel indique l'augmentation de la réduction de fer. L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif.

I-2-6-2 Test de l'activité antibactérienne

1/ Les souches bactériennes utilisées

L'activité antibactérienne a été évaluée contre des souches de référence et des souches pathogènes dont deux sont multi résistantes. Ces bactéries sont conservées et maintenues en vie par des repiquages continus, sur divers milieux de culture solides et liquides, selon les espèces.

Les milieux de culture utilisés sont: des milieux d'isolement, sélectifs ou d'enrichissement pour chaque groupe bactérien.

1-1/ Vérification de la pureté des souches testées

Pour la vérification de la pureté des souches testées, plusieurs tests sont réalisés comme le montre le tableau suivant :

Tableau XI: Les tests réalisés pour la confirmation de la pureté de chaque souche bactérienne.

Tests Souches	Morphologie des colonies	Coloration de Gram	API 20E	Test d'oxydase	Test du catalase	Test de coagulase	Test d'ADN
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	×	×	×	×	×		
<i>Escherichia coli</i>	×	×	×	×	×		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	×	×		×	×	×	×
<i>Salmonella</i>	×			×	×		
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 4352	×	×	×	×	×		
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 825	×	×	×	×	×		
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 1766	×	×	×	×	×		
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	×	×		×	×		

- **Caractère morphologique**

- **La morphologie des colonies bactériennes**

C'est une étude macroscopique. On peut distinguer les caractéristiques d'une colonie : la forme (ronde, entière, ondulée, zonée, filamenteuse...), la taille, la couleur, l'aspect (collant, filamenteux...), L'odeur.

Un repiquage des souches bactériennes, sur des milieux non sélectifs et sélectifs, a été réalisé afin d'étudier les caractéristiques des colonies.

- **La coloration de Gram**

Les bactéries peuvent être groupées en 2 catégories selon la méthode de coloration de Gram. Cette technique a été mise au point en 1884 par Hans Christian Gram, un bactériologiste danois. Après coloration, les bactéries Gram+ deviennent violettes alors que les bactéries Gram- apparaissent en rose. La répartition des bactéries en Gram+ ou Gram- est un critère systématique important pour la classification des bactéries. Elle permet de visualiser facilement les bactéries et de donner des indications sur leurs formes et leurs tailles.

Le colorant utilisé est le violet de gentiane qui colore l'intérieur des bactéries. Celles-ci sont ensuite décolorées à l'alcool-acétone. En raison de leur paroi de structure plus épaisse et de composition chimique particulière, les bactéries Gram+ garde la coloration violette. Les bactéries Gram-, avec une paroi plus fine et plus perméable à la décoloration, perdent la couleur violette. De manière à visualiser les bactéries Gram-, on recolore avec de la fuschine (rose).

- **Critères biochimiques**

- **Galleries API 20E**

API 20 E est un système standardisé pour l'identification des enterobacteriaceae et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux, comprenant 21 tests biochimiques miniaturisés, ainsi qu'une base de données.

La galerie API 20 E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés (voir la figure 18). Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui

reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

Cupule



Microtube contenant le milieu déshydraté

Figure 18: Photos représentant la galerie API 20E.

• Autre tests

Ces tests présomptifs ont été réalisés pour confirmer la pureté des souches bactériennes testées.

➤ Test d'oxydase

La recherche de l'oxydase est un des critères le plus discriminatif et le plus employé pour l'identification des bactéries, surtout celles des bactéries à Gram négatif.

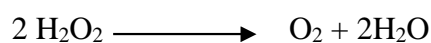
Cette recherche consiste à mettre en évidence la capacité de la bactérie testée, à oxyder la forme réduite incolore de dérivés N-méthylé du paraphénylène diamine, en leurs formes oxydées semi-quinoniques rose-violacées.

Des disques d'oxydases ont été utilisés pour se test.

➤ Test de catalase

Certaines réactions métaboliques aboutissent, dans les conditions de l'aérobiose, à la production de peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée ou H_2O_2). Mais ce composé peut être le produit de la chaîne respiratoire.

La catalase est une enzyme importante. Elle joue un rôle majeur dans l'élimination du peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante :



A partir d'un milieu solide, prélever une quantité suffisante de culture et la mettre en suspension dans une goutte d'eau oxygénée déposée sur une lame :

- Bactérie possédant une catalase : Apparition d'effervescence.
- Bactérie ne possède pas de catalase : Pas d'apparition d'effervescence.

➤ **Test du coagulase**

La coagulase ou staphylocoagulase est une enzyme capable de faire coaguler le plasma sanguin. La mise en évidence d'une activité coagulase libre chez une souche de *Staphylococcus* est un des critères d'identification de *Staphylococcus aureus* en médecine humaine.

Si le plasma coagule en moins de 24h, le germe possède une coagulase.

➤ **Test d'ADNase**

La gélose à ADN au bleu de toluidine est utilisée pour déterminer la présence d'une activité nucléase chez un micro-organisme. En routine, on l'utilise pour identifier l'expression d'une DNase thermorésistante (ou thermonucléase TNase) caractéristique de l'espèce *Staphylococcus aureus*.

L'observation d'un éventuel halo rose de métachromasie signe la présence d'une DNase autour des trous percés sur le fond bleu de la gélose

1-2/ Conservation des souches

Les souches ont été conservées au réfrigérateur dans des tubes stériles contenant 10 ml du bouillon nutritif.

2/ Evaluation de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne de l'extrait aqueux a été évaluée par la méthode de Migheri et *al.*, (2010) qui est basée sur la diffusion en milieu gélosé, celle-ci nous a permis d'évaluer la sensibilité des souches envers l'extrait aqueux et de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) à partir d'une gamme de concentrations de ce dernier.

❖ **Préparation des différentes concentrations de l'extrait**

À partir de la solution mère de notre extrait aqueux 0,8g/ml, des dilutions de demi en demi ont été préparées dans une gamme de concentration allant de 0.025 à 0,8g/ml.

❖ **préparation de l'inoculum**

L'inoculum est obtenu à partir d'une culture jeune de 18 à 24 heures sur gélose PCA, quelques colonies bien isolées de la souche à étudier ont été prélevées de manière à

réaliser une suspension dans de l'eau physiologique stérile. L'inoculum est ensuite ajusté à une densité optique entre [0,08-0,1] à 625nm, équivalent à 10^6 UFC/ml.

❖ **Ensemencement et incubation**

Coulez aseptiquement le milieu de culture (gélose de Mueller-Hinton) en surfusion dans des boîtes de pétri, On laisse refroidir et solidifier.

L'ensemencement est effectué par écouvillonnage, il consiste à tromper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne, l'essorer à l'intérieur du tube puis le frotter sur toute la surface gélosée de façon à avoir des stries serrées. Cette opération est effectuée à trois reprises en tournant la boîte à environ 60° après chaque application pour obtenir une distribution homogène de l'inoculum.

A l'aide d'une pince stérile, prélever un disque de papier wattman de 6mm de diamètre, et l'imbiber avec 10 μ l de chaque dilution à tester, puis déposer sur la gélose. Les boîtes Pétri sont ensuite fermées et laissées diffuser à température ambiante pendant 30 mn, et mises à l'étuve à une température de 37C°.

Après l'incubation l'effet de l'extrait se traduit par l'apparition autour de disque d'une zone circulaire transparente correspondant à l'absence de la croissance. Plus le diamètre de cette zone est grand plus la souche est sensible (Choi *et al.*, 2006).

Les tests ont été répétés trois fois, des disques imprégnés d'eau distillée stérile (témoins négatifs) et des antibiotiques (témoins positif) aussi utilisés. Toutes les déterminations sont faites en triplicata.

❖ **Expressions des résultats**

Les résultats expérimentaux sont exprimés par une CMI qui détermine la concentration minimale inhibitrice (absence de la croissance bactérienne), obtenus par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour des disques à l'aide d'une règle et exprimés selon la moyenne des valeurs obtenues \pm l'écart type (SD).

La sensibilité des bactéries envers les différents composés est classée selon les diamètres des halos d'inhibition comme le montre le tableau ci-dessous.

Matériel et méthodes

Tableau XII: Sensibilité des bactéries envers les différents composés (Moreira *et al.*,2005).

Le diamètre (mm)	$\emptyset < 8$	$9 < \emptyset < 14$	$15 < \emptyset < 19$	$\emptyset > 20$
Sensibilité des bactéries	bactérie non sensible	bactérie sensible	bactérie très sensible	bactérie extrêmement sensible

I-2-6 Analyse statistique

Pour chaque test ou méthode, les moyennes plus ou moins l'écart type (n=4) ou (n=3), ainsi que les représentations graphiques ont été réalisées par le logiciel Excel 2010.

Résultats et discussion

1- Rendement d'extrait

Le rendement de l'extraction (en moyenne \pm écart type) obtenus en pourcentage (%), ainsi que la couleur, l'aspect de l'extrait sont illustrés dans le tableau suivant :

Tableau XIII: Aspect, couleur et rendement d'extrait aqueux *d'Artemisia herba alba* (n=4)

Aspect	Couleur	Rendement%
Poudre	Brune	18.8 \pm 0.80

Ce rendement (18.8%) est considéré comme très important par rapport aux rendements de l'huile essentielle de la même espèce. La teneur en huile essentielle *d'Artemisia herba alba* de la région de Msila (Algérie) est de 1,02% (Dob *et* Benabdelkader, 2006). Le rendement de cette même espèce dans la région de Matmata (Tunisie) est de 0.41% (Akrouf, 2004) et de 0.68% à 1.93% (Haouari, 2009) par contre dans le sud de l'Espagne, le rendement varie de 0,41% à 2,3% (Sofia *et al.*, 2004).

Les variations des rendements au sein d'une plante, semblent être liées aux différents facteurs, propriétés génétiques de la plante ainsi qu'à l'origine géographique, aux conditions et à la durée de stockage et de la récolte et aussi aux méthodes d'extraction appliquées.

2- Résultats de l'étude quantitative

2-1 Dosage des polyphénols totaux

Les polyphénols totaux ont été déterminés par la méthode de Folin-Ciocalteu. L'acide gallique a été utilisé comme standard. L'absorbance a été lue dans une longueur d'onde de 760 nm. Les résultats obtenus sont représentés dans la courbe d'étalonnage ci-dessous :

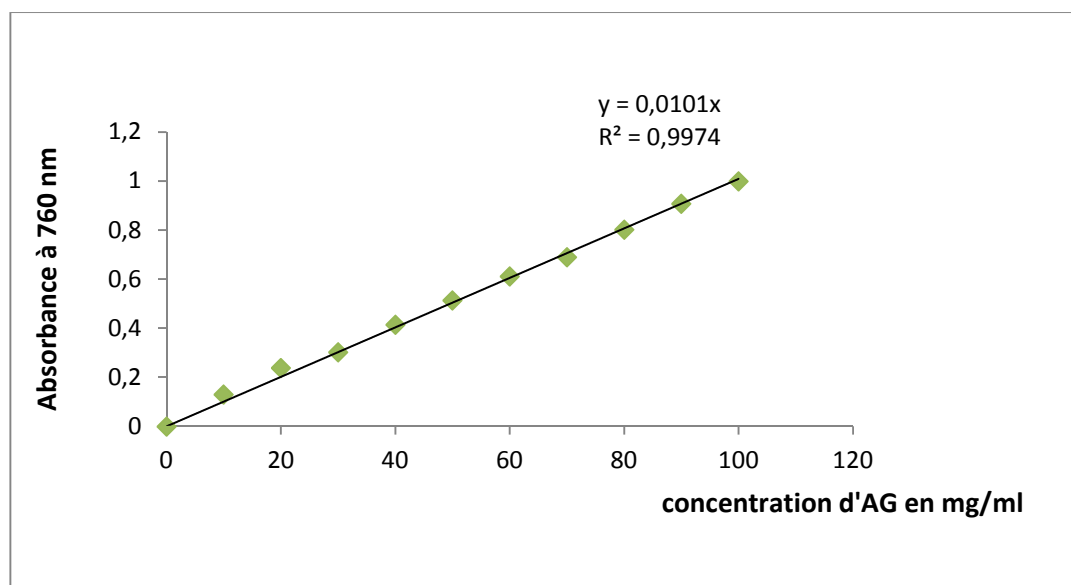


Figure 19: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

L'évaluation quantitative des polyphénols montre une corrélation positive entre la variation de ses polyphénols totaux (10 à 100mg/ml) et l'absorbance avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0.99$.

La quantité des polyphénols a été rapportée en milligramme d'équivalent de l'acide gallique par gramme de poids sec de l'extrait (mg EAG/g Ps).

À partir de la courbe d'étalonnage, la teneur en polyphénols totaux est :

$$T_{pt} = 0.821 \pm 0.061 \text{ mg EAG/g Ps}$$

T_{pt} : Teneur en polyphénols totaux (EAG/g Ps)

Le résultat du dosage des polyphénols totaux montre que l'extrait aqueux d'*Artemisia herba alba* est de : 0.821 mg EAG/g Ps, une concentration très faible en la comparant à celle obtenues par Khennouun *et al.* (2010) qui est de 133,43mg EAG/g Ps.

Alors que dans une autre étude, Djeridane *et al.* (2005), ont dosé les polyphénols totaux dans l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba*, la teneur trouvée était 0.01306 g EAG/g d'extrait brut, ce résultat est relativement inférieur à celui de notre extrait.

Très peu de travaux sont réalisés sur notre plante, nous comparons nos résultats à quelques plantes de la même famille (*astéracées*).

Résultats et discussion

Les composés phénoliques totaux d'*Artemisia arvensis*, *Artemisia campestris* sont respectivement 0.0323 g, 0.02038 g équivalent d'acide gallique/g d'extrait brut (Djeridane *et al.*, 2005).

La quantité de PPT trouvée peut varier selon un certain nombre de facteurs. Les facteurs contribuant à la variabilité dans la teneur en PP pourraient être liée au cultivar, au stade de maturation, des conditions climatiques (température, précipitation), de la période de récolte (Criado *et al.*, 2004 ; Ben Ahmed *et al.*, 2007 ; Gomez-Rico *et al.*, 2008).

2-2 Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode de trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$), la quercétine a été utilisé comme étalon. L'absorbance a été lue dans une longueur d'onde de 420 nm. Les résultats obtenus sont représentés dans une courbe d'étalonnage ci-dessous :

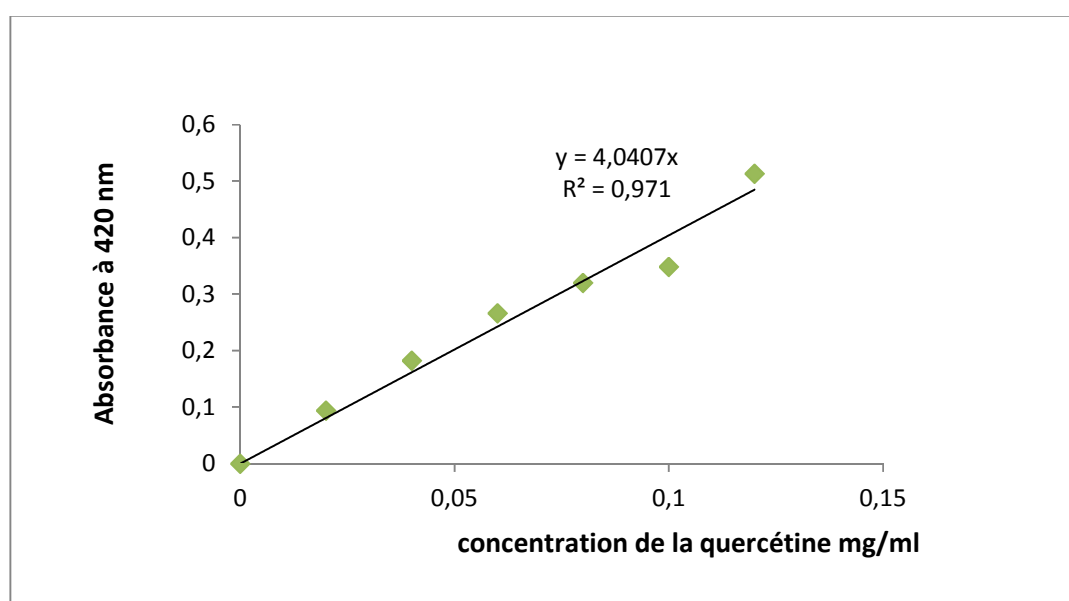


Figure 20: Courbe d'étalonnage de la quercétine.

L'évaluation quantitative des flavonoïdes montre une corrélation positive entre la variation de ses flavonoïdes (0.02 à 0.12mg/ml) et l'absorbance avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0.97$.

La quantité des flavonoïdes a été rapportée en milligramme d'équivalent de la quercétine par gramme de poids sec de l'extrait (mg EQ/mg Ps).

À partir de la courbe d'étalonnage, la concentration des flavonoïdes est :

$$T_f = 0.055 \pm 0.0053 \text{ mg EQ/g Ps}$$

T_f : Teneur en flavonoïdes (mg EQ/mg Ps).

Ce résultat (0.055mg EQ/g Ps) est considéré comme inférieur par rapport au taux obtenu par khannouf *et al.* (2010) qui est de 17,80mg EQ/g Ps.

Alors que dans une autre étude sur l'huile essentielle de la même espèce rapporté par Djeridane *et al.* (2010), la teneur trouvée était 0.0113g EAG/g d'extrait brut, ce résultat est relativement inférieur à celui de notre extrait.

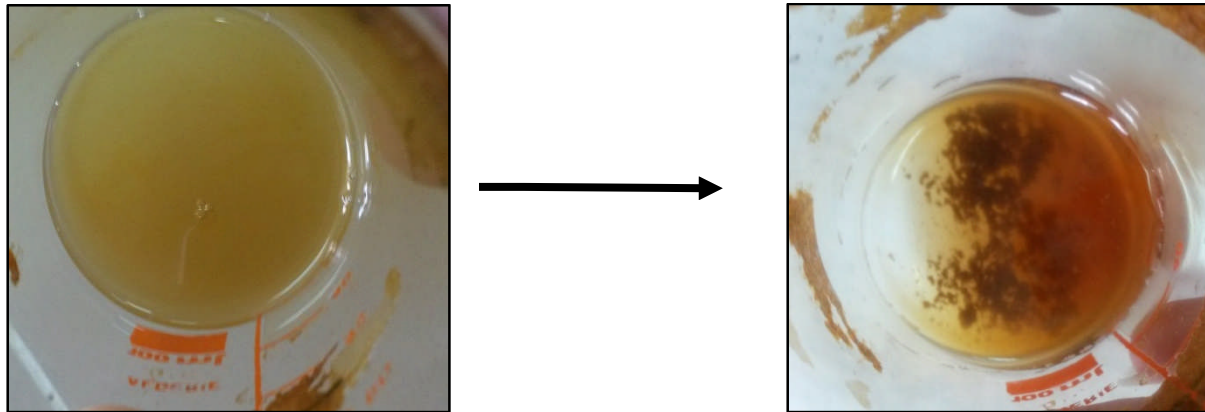
Très peu de travaux sont réalisés sur notre plante, nous comparons nos résultats à quelques plantes de la même famille (*astéracées*). La quantité de flavonoïdes d'*Artemisia arvensis*, *Artemisia campestris* est respectivement 0.0131g, 0,0074g équivalent de catéchine/g d'extrait brut (Djeridane *et al.*, 2005). Nous remarquons que nos résultats sont supérieurs à celles de ces plantes.

Alors que Saoudi *et al.*, (2010) ont trouvé une teneur de 131,89 mg EQ/g d'extrait de feuilles aqueux d'*Artemisia campestris* qui est très importante comparant à notre résultat.

2-3 Mise en évidence de la présence des tanins

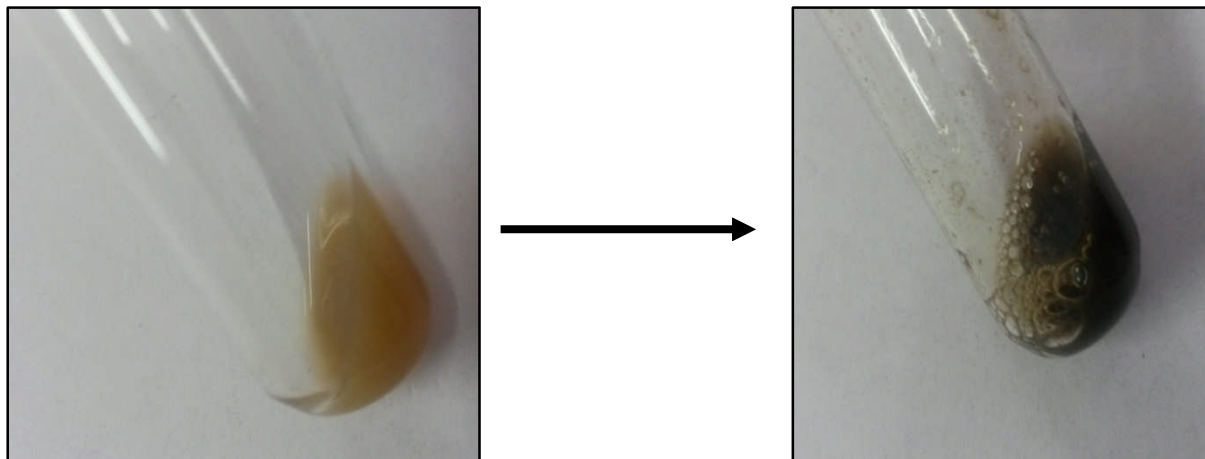
2-3-1 Screening phytochimique

L'observation d'un précipité en gros flocons a caractérisé les tanins catéchiques et l'apparition d'une coloration bleu-noir intense par l'addition de FeCl₃ singe de la présence de tanins gallique comme la montre la figure ci-dessous :



Avant

Apparition des flocons (Tanins catéchique)



Avant

Apparition de la couleur bleu-noir intense
(Tanins gallique)

Figure 21: Révélation des tanins catéchiques et des tanins gallique.

Le screening phytochimique de l'extrait aqueux révèle la présence des tanins, ce résultat est confirmé par Gurudeeban et *al.*, (2010) et Brahmi-Boudjlida. (2014), qui ont marqué la présence de plusieurs métabolites secondaires tels que les tanins dans l'extrait aqueux de la plante d'*Artemisia herba alba*.

La caractérisation chimique des extraits aqueux des plantes a démontré la présence des polyphénols sous forme de tanins (la quantité dans l'*Asphodelus tenuifolius* très abondant que l'*Artemisia herba alba* et *Cotula cinerea*) (Brahmi-Boudjlida, 2014).

2-3-2 Dosage des tanins

Le dosage des tanins a été réalisé selon la méthode colorimétrique de Folin Denis. L'absorbance a été lue dans une longueur d'onde de 760 nm. Les résultats obtenus sont représentés dans la courbe d'étalonnage ci-dessous :

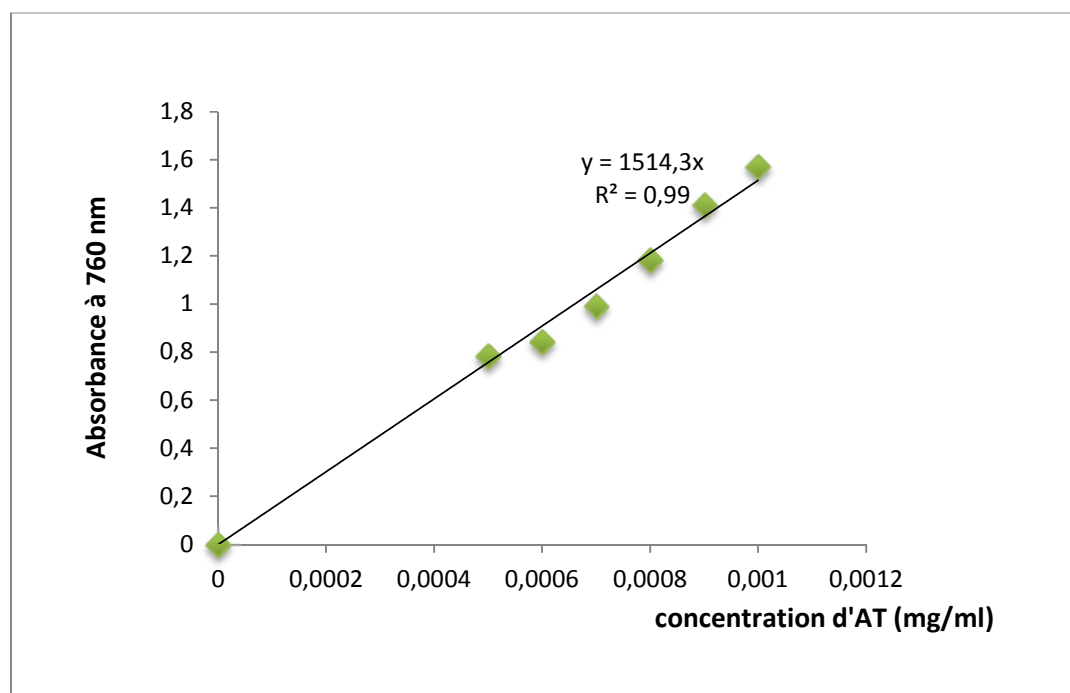


Figure 22: Courbe d'étalonnage de l'acide tannique.

L'évaluation quantitative des tanins montre une corrélation positive entre la variation de se tanin (0 à 1mg/ml) et l'absorbance avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0.99$.

La quantité des tanins a été rapportée en milligramme d'équivalent d'acide tannique par gramme de poids sec de l'extrait (mg EAT/g Ps).

À partir de la courbe d'étalonnage, la concentration des tanins est :

$$T_t = 7.99 \times 10^{-5} \pm 1.96 \times 10^{-6} \text{ mg EAT/g Ps}$$

T_t : Teneur en tanins (mg EAT/g Ps).

D'après nos résultats, on remarque que la teneur en tanins de notre extrait aqueux d'*Artemisia herba alba* est très faible avec une concentration de 0.0000799 mg EAT/g Ps.

Alors que, une concentration de 0.175 mg EC/g d'extrait est obtenue de la même espèce par khirddine. (2013).

L'étude quantitative de l'extrait aqueux d'*Artemisia herba alba*, au moyen des dosages spectrophotométriques, avait pour objectif la détermination de la teneur des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tanins.

La raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes des plantes leur sont attribués.

3- Résultats des tests des activités biologiques

3-1 Test de l'activité antioxydante

- **Test de piégeage du radical libre DPPH**

La méthode de piégeage du radical libre (DPPH) a été retenue pour évaluer l'activité antioxydante de notre extrait aqueux, car elle est reconnue comme étant simple, rapide et efficace en raison de la grande stabilité du radical (Bozin *et al.*, 2008).

Le pouvoir antiradicalaire du standard (acide ascorbique) est illustré dans la figure ci-après :

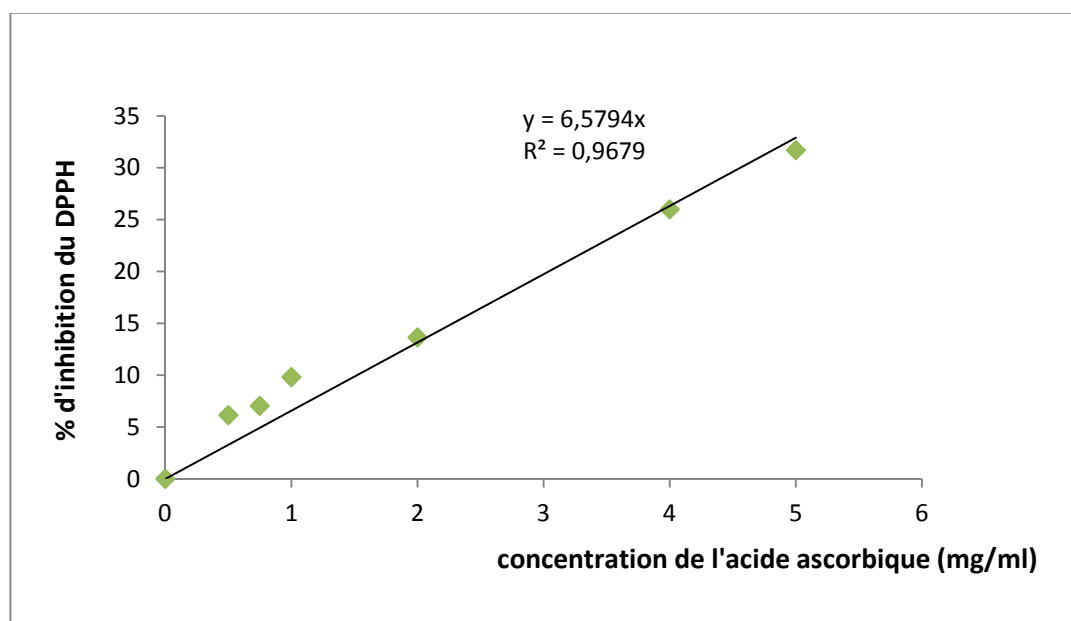


Figure 23: Pouvoir antioxydant de l'acide ascorbique.

D'après la figure 23, nous constatons que l'acide ascorbique révèle une corrélation positive entre la variation de la concentration de l'acide et le pourcentage d'inhibition avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,96$.

Résultats et discussion

L'activité antiradicalaire à une concentration de 0.8mg/ml de l'extrait aqueux a donné un pourcentage équivalent de 4.34%, pour ce même pourcentage l'antioxydant standard (acide ascorbique) à une concentration de 0.66mg/ml. On constate donc que l'activité antiradicalaire de l'extrait aqueux est inférieure à celle du standard.

L'extrait aqueux d'*Artemisia herba alba*, possède un IC₅₀ (0,329mg /ml) très important en le comparant aux IC₅₀ des polyphénols standard utilisés (quercétine : 0,005 mg/ml, catéchine: 0,004mg/ml, l'acide caféique: 0,004mg/ml, acide tannique : 0,002mg/ml), Une valeur faible d'IC₅₀ indique une activité antioxydante forte. (Khenouf *et al.*, 2010)

D'après Khebri. (2011), l'activité antiradicalaire de l'huile essentielle de la même espèce a donné un pourcentage de 37% pour une concentration de 1mg/ml, cette même concentration d'acide ascorbique un pourcentage supérieur à 80%.

Les résultats de l'activité antiradicalaire de ces travaux sont en accord avec nous résultat, qui montre que *Artemisia herba alba* est doté d'une faible activité anti-radicalaire moins importante que celle des polyphénols standard.

L'évaluation de l'activité anti-radicalaire doit être interprétée avec précaution du fait que l'absorbance du DPPH• à 515-520 nm diminue sous l'action de la lumière, de l'oxygène, en fonction du pH et le type du solvant additionne à l'antioxydant. La structure chimique et la polarité de l'antioxydant sont déterminantes pour sa capacité à piéger les radicaux libres. Des effets synergiques mais aussi antagonistes ont été observés dans des solutions modèles qui contiennent plusieurs composés fonctionnels (mélange complexe ou poly moléculaires) à activité anti-radicalaire (Popovici *et al.*, 2009).

- **Test de la réduction du fer FRAP**

Par ce test, on évalue la capacité d'un composé à transformer le Fe³⁺ en Fe²⁺. On détermine ainsi la capacité de ce composé à donner des électrons. Cette propriété constitue un important mécanisme de l'action antioxydante.

La figure 24 ci-après, montre les DO lues lors du test de la réduction du ferrocyanure de potassium par notre extrait aqueux et l'acide ascorbique pris comme étalon :

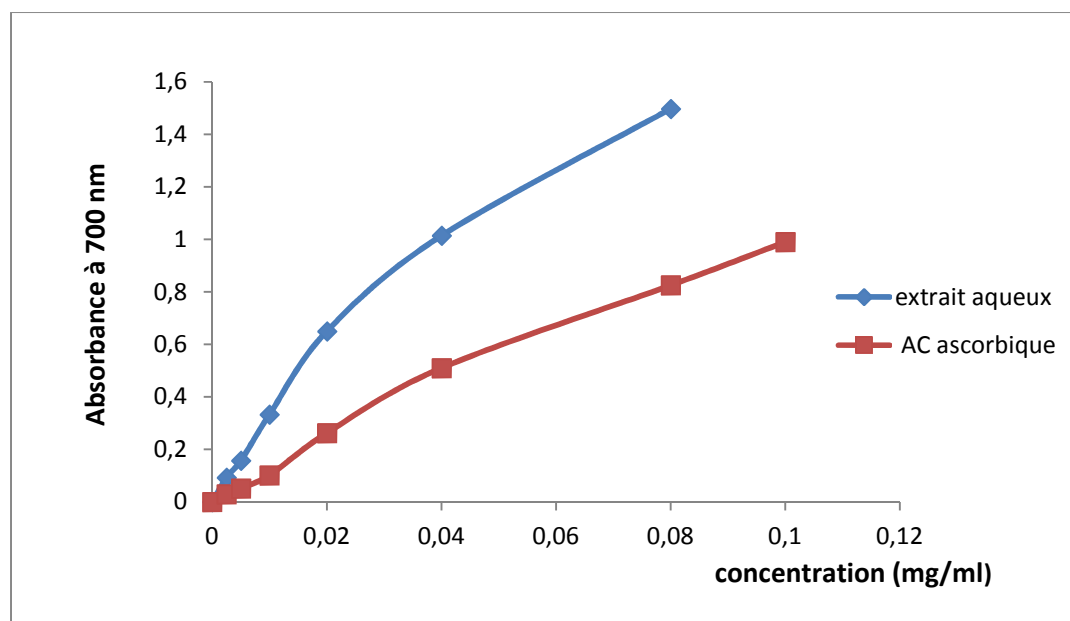


Figure 24: Pouvoir réducteur de l'extrait aqueux et de l'acide ascorbique.

Le pouvoir réducteur de l'extrait aqueux et de l'acide ascorbique évolue avec l'augmentation de la concentration. Plus l'absorbance mesurée à 700 nm augmente plus le pouvoir réducteur du composé est élevé (Ebrahimzadeh *et al.*, 2008).

Pour comparer l'activité de notre extrait aqueux à celle de l'acide ascorbique, on détermine le pouvoir réducteur $PR_{0,5}$ défini comme la quantité d'une substance en mg par ml du volume réactionnel qui donne une unité d'absorbance de 0,5 à 700nm (Ardestani *et* Yazedanparast, 2007).

D'après la figure 24, l'extrait aqueux présente un $PR_{0,5}$ avec une concentration de 0,024mg/ml alors que pour l'acide ascorbique, elle est de 0,048mg/ml (on remarque que la concentration de l'acide ascorbique est deux fois la concentration de notre extrait aqueux). On constate que notre extrait aqueux possède un pouvoir réducteur deux fois plus important que celui de l'acide ascorbique.

D'après la comparaison des résultats fournis par les deux méthodes (test de piégeage du radical libre DPPH et test de la réduction du fer FRAP), on constate que cette différence est due à la nature du standard : l'acide ascorbique est une molécule polaire possédant un pouvoir antioxydant puissant évalué avec la technique de DPPH, mais cette molécule est dotée d'une faible activité antioxydante avec la technique du FRAP.

3-2 Test de l'activité antibactérienne

3-2-1 Identification et purification des souches

3-2-1-1 Caractère morphologique

➤ **La morphologie des colonies bactériennes**

C'est une étude macroscopique qui nous permet de distinguer les caractéristiques des colonies des souches testées.

- ✓ La forme.
- ✓ La couleur.
- ✓ L'aspect.
- ✓ L'odeur.

- ***E. Coli*** : Colonies 2 à 3mm de diamètre, à contour régulier, de type S en général. Sur milieux sur coliforme comme gélose au désoxycholate à 1% : colonies rouges.
- ***S. aureus*** : Colonies rondes, lisses, blanches sur le milieu PCA et dorées sur milieu chapman, opaques, atteignant 2 à 3 mm de diamètre.
- ***Klebsiella pneumoniae*** : Colonies lisses, brillantes, de structure homogène (type « smooth » ou S). Cet aspect évolue après cultures successives pour donner des colonies à surface sèche rugueuse (type « rough » ou R) souvent très muqueuses, larges et luisantes.
- ***Salmonella*** : Colonies lisses, brillantes, de structure homogène (type « smooth » ou S), incolores car lactose – sur milieux SS avec un centre noir car H_2S^+ .
- ***Bacillus cereus*** : Colonies blanches d'aspect granuleux font entre 2 et 7 mm de diamètre.

Pour l'aspect des colonies de ces souches testées voire l'annexe (7).

➤ **La coloration de Gram**

Les bactéries Gram⁺ resteront violettes alors que les Gram⁻ seront maintenant teintées en rose (voir tableau XIV, figure 27). Bien que le résultat de la coloration de Gram peut dépendre de l'état physiologique des bactéries (âge de la colonie, conditions de croissances...).

Résultats et discussion

Tableau XIV : Résultat de la coloration de Gram et l'aspect des colonies des différentes souches bactériennes utilisées.

Souches bactériennes	Gram +/-	Aspect des colonies
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Gram-	Contour régulier, type S....
<i>Escherichia coli</i>	Gram-	Contour régulier, type S....
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Gram+	Colonies rondes, lisses....
<i>Salmonella</i>	Gram-	Colonies lisses, brillantes...
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 4352	Gram-	Colonies lisses, brillantes, muqueuses, larges.....
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 825	Gram-	Colonies lisses, brillantes, muqueuses, larges.....
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 1766	Gram-	Colonies lisses, brillantes, muqueuses, larges.....
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	Gram+	Colonies blanches, aspect granuleux.....

3-2-1-2 Critères biochimiques

➤ Galeries API 20E

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de Lecture (voir annexe 10) et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification.

Les résultats de la galerie API 20 E sont représentés dans le tableau XV ci-après :

Résultats et discussion

Tableau XV : Résultats des galeries testés.

	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	UREE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
<i>E. Coli</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+
<i>Kp</i> 4352	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>Kp</i> 1766	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Kp</i> 825	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

● **Autres tests**

Pour l'identification de la pureté des souches on a réalisé d'autre test :

➤ **Test d'oxydase**

- ✓ Le disque prend une teinte rose, violette. Le germe possède une oxydase : le test est positif (+).
- ✓ Le disque reste incolore, le germe ne possède pas d'oxydase, le test est négatif (-).

➤ **Test de catalase**

- ✓ Une réaction positive (+) se traduit par un dégagement gazeux (parfois très faible) d'oxygène.
- ✓ Une réaction négatif (-) se traduit par l'absence du dégagement gazeux.

Les résultats des deux tests (oxydase, catalase) sont représentés dans le tableau suivant :

Résultats et discussion

Tableau XVI : Résultats des deux tests (oxydase, catalase) pour toutes les souches utilisées.

Souches bactériennes	Négatif (-) / Positif (+)	
	Oxydase	Catalase
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	(-)	(+)
<i>Escherichia coli</i>	(-)	(+)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	(-)	(+)
<i>Salmonella</i>	(-)	(+)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 4352	(-)	(+)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 825	(-)	(+)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 1766	(-)	(+)
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	(-)	(+)

➤ Test du coagulase

Ce test est réalisé pour la purification de la souche *staphylococcus aureus* et les résultats observés :

- ✓ Prise en masse du contenu du tube.
- ✓ Coagulation du plasma.
- ✓ Souche coagulase libre + Orientation vers *Staphylococcus aureus* (Voir annexe 10).

➤ Test d'ADNase

L'observation d'un éventuel halo rose de métachromasie signe la présence d'une DNase autour des trous percés sur le fond bleu de la gélose (Voir annexe 11).

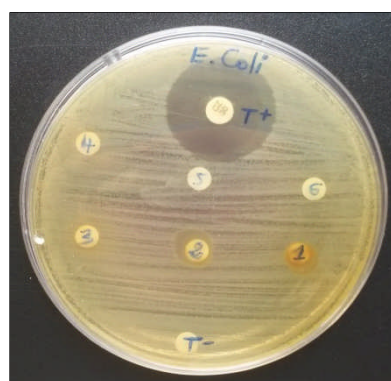
Résultats et discussion

4-2-2 Méthode de diffusion en milieu solide

4-2-2-1 Déterminations de la CMI

La concentration minimale inhibitrice est définie comme étant la concentration la plus basse rapportée pour donner une inhibition complète des bactéries testées après 48 heures d'incubation (Wan et *al.*, 1998 ; Canillac et Mourey, 2001).

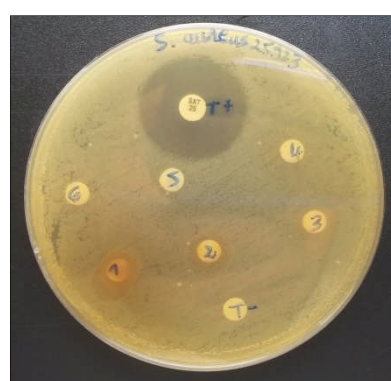
L'activité antibactérienne de l'extrait aqueux d'*Artemisia herba alba* est la CMI pour quelque souches bactériennes testées, comme le montre les photos de la figure 25 et le tableau XVII ci-dessous :



CMI: 0.4g/ml.
Eq: 11 ± 2 .



CMI : 0.4g/ml.
Eq: 9.2 ± 2.8 .



CMI: 0.8g/ml.
Eq: 12.7 ± 1.3 .



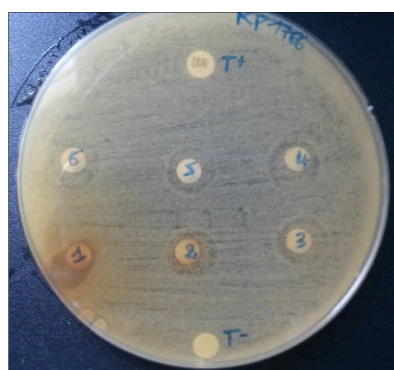
CMI : 0.4g/ml.
Eq: 12.2 ± 1.7 .



CMI : 0.8g/ml.
Eq: 12.2 ± 0.7



CMI: 0.8g/ml.
Eq: 10.3 ± 0.8 .



CMI : 0.8g/ml.
Eq: 7.6 ± 1.6 .



CMI : 0.4g/ml.
Eq: 13 ± 3 .

Résultats et discussion

1 : 0.8g/ml ; 2 : 0.4g/ml ; 3 : 0.2g/ml ; 4 : 0.1g/ml ; 5 : 0.05g/ml ; 6 : 0.025g/ml.

T⁺: témoin positif.

T⁻ : témoin négatif (10µl de l'eau distillé stérile).

Figure 25 : Effet de l'extrait aqueux sur les huit souches testées.

Tableau XVII : Diamètre des zones d'inhibitions en mm de l'extrait aqueux d'*Artemisia herba alba*. (n=3)

Souches	[] de l'extrait aqueux g/ml						Antibiotiques	Ø (mm)
	0.8	0.4	0.2	0.1	0.05	0.025		
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	9.2 ± 2.8	7.5 ± 2.8	-	-	-	-	CZ	27
<i>Escherichia coli</i>	11 ± 2	9.3 ± 2.8	-	-	-	-	CZ	28
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	12.7 ± 1.3	-	-	-	-	-	SXT	24
<i>Salmonella</i>	12.2 ± 1.7	10.5 ± 2.1	-	-	-	-	CZ	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 4352	12.2 ± 0.7	-	-	-	-	-	CZ	20
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 825	10.3 ± 0.8	6.1 ± 5.4	-	-	-	-	CZ	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 1766	7.6 ± 1.6	-	-	-	-	-	CZ	-
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	13 ± 3	11.8 ± 1.9	-	-	-	-	AMX	10
- : pas de zone								

CZ : Cefazoline ; **SXT** : Triméthoprime + Sulfaméthoxazole ; **AMX** : Amoxicilline

Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures ± SD.

L'extrait aqueux d'*Artemisia herba alba* a réagi positivement sur toutes les souches bactériennes testées qui confirme que cette dernière est douée de propriétés antibactériennes.

Plusieurs recherches scientifiques ont prouvé l'efficacité des extraits ou de l'huile essentielle de l'*Artemisia herba alba* aussi bien sur des bactéries que des levures (Ramezania *et al.*, 2004 ; Zouari *et al.*, 2010), ce qui confirme les résultats obtenus lors de notre étude.

D'après les résultats de la figure 29, les CMI ont été déterminées pour les différentes souches bactériennes : les souches de *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Klebsiella pneumoniae* 825, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* ATCC 25922 ont été les plus sensibles à l'extrait aqueux avec une CMI de 0.4g/ml, tandis que les trois autres souches *Klebsiella pneumoniae* 1766, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 semblent plus résistantes avec une CMI de 0.8g/ml.

D'après Boudjouref. (2011), la souche d'*E. Coli* ATCC 25922 a été la plus sensible aux extraits organiques de la plante d'*Artemisia campestris* L, avec une CMI de 0.5 mg/ml alors que une CMI de 1.8 mg/ml pour *S. aureus* ATCC 25923.

4-2-2-2 La détermination de la sensibilité des souches testées

L'eau distillée stérile qui a été utilisé en tant que contrôle négatif n'a montré aucun effet inhibiteur sur la croissance bactérienne.

Les trois (03) antibiotiques standards sont choisis à base de la sensibilité des souches bactériennes testées, nous avons observé que les différentes souches réagissent différemment à ces antibiotiques.

L'activité de l'extrait aqueux est faible par rapport à celles des témoins (antibiotiques) pour les souches : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352 d'une part, d'autre part il a une activité remarquable pour : *Salmonella*, *Klebsiella pneumoniae* 825, *Klebsiella pneumoniae* 1766, *Bacillus cereus* ATCC 10876 alors qu'elles sont résistantes vis-à-vis de ces antibiotiques.

B. cereus et *S. aureus* se révèlent les plus sensibles envers l'extrait aqueux d'*Artemisia herba alba* avec des diamètres de 13 ± 3 et $12,7 \pm 1.3$ respectivement.

Par contre, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* 825, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* 1766, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352 étaient

Résultats et discussion

un peu plus résistantes envers l'extrait aqueux avec des diamètres de 9.2 ± 2.8 , 10.3 ± 0.8 , 12.2 ± 1.7 , 11 ± 2 , 7.6 ± 1.6 , 12.2 respectivement.

Nous remarquons que l'extrait aqueux d'*Artemisia herba alba* agit sur les bactéries Gram (+) que Gram (-). L'hypersensibilité de ces souches peut s'expliquer par la probabilité de la sensibilité des bactéries Gram (+) au changement environnementaux externes, tels que la température, le pH et les extraits naturels due à l'absence de la membrane externe (Balentine *et al.*, 2006).

Nos résultats semblent être plus importants que celle apportées par d'autres études sur l'extrait aqueux d'*Artemisia herba alba* qui a donné un diamètre de 6mm pour les souches : *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Bacillus* Khennouf *et al.*, (2010). Talbi. (2015) a mentionné un diamètre de 6mm pour *E. coli* et une absence totale d'une activité antibactérienne de l'extrait aqueux de la même plante vis-à-vis du *Staphylococcus aureus*.

Alors que les travaux portés par Boudjelal. (2013), l'extrait méthanolique d'*Artemisia herbe alba* a donné des diamètres de : 18 ± 0.7 , 13 ± 0.6 pour *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* ATCC 25922 respectivement. Ces résultats se montrent plus importants que celle de notre étude et ce là peut être dû au solvant utilisé.

D'après les résultats obtenus, on a classé les souches testées selon leurs degrés de sensibilité vis-à-vis de l'extrait aqueux comme le montre le tableau suivant :

Tableau XVIII : Degrés de sensibilité des souches testées.

Souches bactériennes	Degrés de sensibilité
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Sensible
<i>Escherichia coli</i>	Sensible
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Sensible
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 4352	Sensible
<i>Salmonella</i>	Sensible
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 825	Sensible
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 1766	Non sensible
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	Sensible

Conclusion

Conclusion

De nos jours, un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales possède des propriétés biologiques très importantes qui trouvent de nombreuses applications dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et l'agriculture. Ce regain d'intérêt vient d'une part du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances bioactives, et d'autre part les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs qui se retournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme.

Dans le présent travail, différents aspects d'*Artemisia herba alba* ont été étudiés: quelques propriétés phytochimique et activités antioxydantes et antibactériennes de l'extrait aqueux.

L'extraction aqueuse de la partie aérienne de la plante a permis d'obtenir un rendement assez intéressant, alors que la teneur en polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins était conséquente.

L'activité antioxydante de l'extrait aqueux d'*Artemisia herba alba* été évaluée par deux méthodes: le test de la réduction du fer (FRAP) et la méthode de réduction de radical libre DPPH. Pour le premier test les résultats ont montré que l'extrait aqueux a un pouvoir plus important que celui du standard utilisé. Pour le test de réduction du radical libre DPPH, l'activité antiradicalaire de l'extrait aqueux était faible en le comparant à celle de l'antioxydant standard.

L'activité antibactérienne a été déterminée sur huit souches bactériennes, selon la méthode de diffusion en milieu gélosé, Les résultats indiquent que l'extrait possède une activité antibactérienne sur toutes les souches testées.

À la suite de ces résultats, il serait donc intéressant d'étendre l'éventail des tests antioxydants et antimicrobiens ainsi que l'isolement et la caractérisation des composés actifs dans les différents extraits en vue d'identifier les différentes molécules responsables des différentes activités biologiques de cette plante.

L'ensemble de ces résultats obtenus *in vitro* ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances d'origine naturelle biologiquement active, une étude *in vivo* est souhaitable, pour obtenir une vue plus approfondie sur les activités antioxydante et antibactérienne de l'extrait aqueux de cette plante.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abderrazak M. et Joël R., 1983.** La botanique de A à Z. Ed. Dunod. Paris. 177p.
- Aidoud.A, 1983** Contribution à l'étude des écosystèmes steppiques du sud 3^{ème} cycle, univ, sci, tech, Houari Boumediène, Alger.
- Akrout A. 2004.** Etude des huiles essentielles de quelques plantes pastorales de la région de Matmata (Tunisie). In : Ferchichi A. (comp.), Ferchichi A. (collab.). *Réhabilitation des pâturages et des parcours en milieux méditerranéens*. Zaragoza : CIHEAM, 2004. p. 289-292 (Cahiers Options Méditerranéennes; n. 62).
- Alkhazraji, S.M.; Alshamaony, L.A.; Twaij, H.A.A., Journal of Ethnopharmacology., 1993, 40(3),163-166.**
- Anonyme, 2011 :** Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale (Médecine humaine et vétérinaire).Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques, document édité avec la collaboration de l'OMS.
- Atawodi S. E. (2005).** Antioxidant potential of African plants.*African J. of Biotec.***4 (2):** 128-133.
- Ardestani A. and Yazdanparast R. (2007).** Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. *Food Chem.*, 104 :21-29.
- Avissar N., WhitinJ.C., and Allen P.Z. (1989).** Plasma selenium-dependent glutathione peroxidase.*J. Biol. Chem.* **2:** 15850-15855.
- Balentine, C.W., Crandall P.G, O'Bryan, C.A., Duong, D.Q., Pohlman, F.W. 2006.** The pre- and post-grinding application of rosemary and its effects on lipid oxidation and color during storage of ground beef. *Meat Science*, 73:413-421.
- Barry N., Manley R., Ducan J., 1986-** The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep⁴. Sites of carbohydrate and protein digestion as influenced by dietary reactive tannin concentration. *British Journal of Nutrition*, 55: 37-123.
- Ben Ahmed C., Ben Rouina B. and Boukhris M. (2007).** Effects of water deficit on olive trees cv. Chemlali under field conditions in arid region in Tunisia. *Sci. Hortic.*, 113 : 267-277.
- Bendjilali. B, Richard. H., 1980.** Etude de quelques peuplements d'armoise blanche du Maroc. *Artemisia herba alba*, *Rivista Italiana E.P.P.O.S*, LXII, (2)-69-74.
- Bendjilali. B, Richard. H; Liddle. P., 1984** chémotypes d'armoise blanche du Maroc, congrès international de la société italienne de phyto-chimie, 131-151.
- Békro Y. A., Békro J. A. M., Boua B. B., TRA B. F. H. & Ehilé E. E., 2007.** Etude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthamiana* (Baill.) Herend. Et Zarucchi (Caesalpiniaaceae). *Rev. Sci. Nat.* Vol. **4 (2) :** 217-225.

Références bibliographiques

- Benson, R.F., Fields, B.S., 1998.** Classification of the genus *Legionella*. *Semin. Respir. Infect.* 13:90-99
- Bernal J., Mendiola E., Ibanez A., 2010-** Advanced analysis of nutaceuticals.
- Bezza L., Mannarino A., Fattarsi K., Mikail C., Abou L., Hadji-Minaglou F., Kaloustian J. 2010.** Composition chimique de l'huile essentielle d'*Artemisia herba-alba* provenant de la région de Biskra (Algérie). *Phytothérapie.*, **8** : 277-281.
- Boizot N., and Charpentier .J.P. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre foustier. *Le cahier des techniques de l'Inra.* Pp 79-82. (cited in DjemaiZoueglache S, 2008).
- Bornstein, N., Fleurette, J., 1992.** *Legionella*, In: Manuel de bactériologie clinique, Frenay, J., Renaud, F., Hansen, W., Bollet, C. (ed.), 2ème édition, Elsevier, Paris, 1601-1087.
- Boudjelal Amel, 2013 :** Extraction, identification et détermination des activités biologiques de quelques extraits actifs de plantes spontanées (*Ajuga iva*, *Artemisia herba alba* et *Marrubium vulgare*) de la région de M'Sila, Algérie. Thèse pour l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences. Badji- Mokhtar
- Bouldjadj, 2009 :** étude de l'effet antidiabétique et antioxydant de L'extrait aqueux lyophilisé d'*artemisia herba alba* asso Chez des rats sains et des rats rendus diabétiques par Streptozotocine. P 31
- Bouraoui N., Lafi B. (2003).** Plantes médicinales dans les traitements traditionnels (fréquence d'utilisation, formes de préparation et pathologies traitées). Mémoire de fin d'études supérieures section nutrition humaine, Ecole supérieure des sciences et techniques de la santé. Tunis
- Boutekjenet. C, 1987.** Contribution à l'étude chimique d'*artémisia herba alba*, projet de fin d'étude en génie chimique. Ecole nationale polytechnique Alger, **1987**.
- Boyd B., Ford C., Koepke M.C., GaryK., Horn E., McAnalley S., and McAnalley B. (2003).** Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose sur des personnes en bonne santé. *Glycoscience & Nutrition.* **4 (6):7.**(cited in Mohammedi Z, 2005).
- Bozin B., Mimica-Dukic N. et Samojlik I. (2008).** Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., *Alliaceae*). *Food Chemistry.*, 111:925–929.
- Brahmi Boudjlida, 2014 :** Etude in vitro de l'effet allélotoxique des extraits aqueux des quelque plantes spontanées sur la croissance des quelque moisissures associé aux céréales.
- Bruneton, J. (1999).** Pharmacognosie, Phytochimie – Plantes médicinales – 3ème Ed Techniques et documentations. Paris. pp: 227-310-312-313-314.494.

Références bibliographiques

Canillac N., and Mourey A. (2001). Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excels* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. *Food Microbiol.***18**: 261– 268.

Celles. J. (1980). Biologie et écologie végétales des régions arides univ de Nice., 1 20.15-
POUGET. M.

Choi Y.M., Noh D.O., Cho S.Y., Suh H.J., Kim K.M., and Kim J.M. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT.* **39**:756-761.

Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de master académique. Ouargla

Cohen Y et Jacquot C. (2001). Pharmacologie. 5ème Ed. Masson. Paris. 350p

Coil, D.A., Anne, J., 2009. Twitching motility in *Legionella pneumophila*. *FEMS Microbiol. Lett.***293**:271-277.

Criado M.N., Morello J.R., Motilva M.J. and Romero M.P. (2004). Effect of growing area on pigment and phenolic fractions of virgin olive oils of the arbequina variety in Spain *JAOCS.*, 81: 633-640.

CSH. 2002. Recommandation pour la prévention des infections à *Legionella* dans les établissements de soins. Groupe de travail *Legionella*. N° CSH 7509, adit janvier 2002.

Dahmani-Hamzani N., Baaliouamer A. 2005. Chemical composition of the Algerian essential oil of *Artemisia herba-alba* native to Dejelfa. *Riv. Ital. EPPOS.*, **40** : 7-13.

Ebrahimzadeh M.A., Pourmorad F. and Hafezi S. (2008). Antioxidant Activities of Iranian Corn Silk. *Turk. J. Biol.*, 32, 1-7.

Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stoker., Vidai N. (2005). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants. extracts containing phenolic compounds. *Food chemistry* 97 p 654-660

Dob T., Benabdelkader T. (2006). Chemical composition of the essential oil of *Artemisia herba-alba* Assou grown in Algeria. *The Journal of essential oil research*, vol. 18, n°6, pp. 685-690.

Elghozi J.L., Duval D. (1992). Pharmacologie 2ème Ed : Médecine Flammarion. Paris. 289p.

Elkouali M'Hammed. Laboratory of Analytical Chemistry and Physical Chemistry of Materials, University of Hassan II Casablanca, Faculty of Sciences BEN M'SIK BP 7955, Casablanca, Morocco, laboratory of Biotechnology and Molecular Toxicology, University of Hassan II Casablanca Ain Chok Faculty of Sciences, Morocco.

Euro plus Med.

Faucher J L. 1997. Bactériofiche : Technique de bactériologie clinique. Ed : Copyright 2002. P1-15.

Références bibliographiques

- Favier A. (2003).** Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*. pp: 108-115.
- Feuerstein L. Muller D. Hobert. K. Danin A. Segal R. (1986).** The constituents of essential oils from *Artemisia herba alba* population of Israel and Sinai. *Phytochemistry* 25, 2343-2347.
- Feuerstein I., Danin A., Segal R. 1988.** Constitution of the essential oil from an *Artemisia herba-alba* population of Spain. *Phytochemistry.*, 27 (2) : 433-434.
- Fields, B.S., Benson, R.F., Besser, R.E., 2002.** *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin. Microbiol. Rev.* 15:506-26.
- Francis Joannès, 2001.** Dictionnaire de la civilisation mésopotamienne. Ed Robert Laffont ISBN2-221-09 207-4.
- Freney J., Renaud F., Hasenert W., Bollet C. 2000.** Précis de bactériologie Clinique. Ed : ESKA, Paris. P1389-1405.
- Friedman J., Vaniç ĩ Dafni 4., Palewiteh. D.,, (1986'** A. pretiminiry classification of the healing potential of medicinal plants, based on a rational analysis of an ethnopharmacological field *sriey* among Bedouins- in the Negev desert, Israel. *J Ethno.* Jun.; 16(2-3):275-8.7.
- Fry, N.K., Warwick, S., Saunders, N.A., Embley, T.M., 1991.** The use of 16S ribosomal RNA analyses to investigate the phylogeny of the family *Legionellaceae*. *J. Gen. Microbiol.* 137:1215-1222.
- Ganther H.E. (1999).** Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxinreductase. *Carcinogenesis*.20 (19): 1657- 1666.
- Garcia-Ruiz A., Bartolomé B., Martinez-Rodriguez A.J., Pueyo E., Martin-Alvarez P.J., and Moreno-Arribas M.V. (2008).** Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine. *Food Control*. 19: 835–841.
- Gardès-Albert M, Dominique Bonnefont-Rousselot, Zohreh Abedinzadeh Z et Daniel Jore D. (2003).** Espèces réactives de l'oxygène: Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? *L'actualité chimique*. pp: 91-96.
- Georgetti S.R., Casagrande R., Di Mambro V. M., Azzolini Ana ECS et Fonseca Maria J.V. (2003).** Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the chemiluminescencemedhod. *AAPS Pharm Sci.* 5 (2):5p.
- Ghestem A., Seguin E., Paris M., and Orecchioni A.M. (2001).** Le préparateur en pharmacie dossier 2èmeEd TEC&DOC. Paris. pp275. (cited in Djemai Zoueglache S, 2008).

Références bibliographiques

- Gomez- Rico A., Fregapane G. and Salvador M.D. (2008).** Effect of cultivar and ripening on minor components in spanish olive fruits and their corresponding virgin olive oils. *Food Res. Int.*, 41: 433-440.
- Gomez-Valero, L., Rusniok, C., Buchrieser, C., 2009.** *Legionella pneumophila* : population genetic, phylogeny and genomics. *Infect. Genet. Evol.* 9:727-39.
- Gurudeeban, Rajamanickam, Ramanathan & Satyavani, 2010:** Antimicrobial activity of *Citrullus colocynthis* in Gulf of Mannar. *International Journal of Current Research* 2, 078-081.
- Gutteridge J.M. (1993).** Free radicals in disease processes: a complication of cause and consequence. *Free Radic. Res. Commun.* 19: 141-158.
- Haouari Mohsen - Ferchichi Ali. Molecules 2009, 14,** 1585-1594: « Essential Oil Composition of *Artemisia herba-alba* from Southern Tunisia”.
- Huang Guangrong., Jiang Jiaxin.,and Dai Dehui. (2008).** Antioxidative and antibacterial activity of the methanol extract of *Artemisia anomala* S. Moore. *African Journal of Biotechnol.*7 (9): 1335-1338.
- Hurabielle. M., Malsot. M, Paris. M., 1981.** Contribution à l'étude chimique de deux huiles d'Artémisia : *Artémisia herba alba* asso et *Artémisia vulgaris* linnaeus; intérêt chimiotaxonomique, rivista italiana E.P.P.OS, LXIII (6), 296-299.
- IPNI.** The international plant name Index.
- Jacques B, and André R. (2004).** Biochimie métabolique Ed ellipses .Paris. pp: 217-219-220-223-225.
- Jarraud S., Clowerence., M Reyrolle., C Nauceil.,J Etienn. 2000.** Les infections nosocomiales à *Legionella pneumophila*. Méd .Ther. Vol. 6. N°1
- Joslyn M. A., 1970.** A serie of monographies. J. Food. Sci. Techn. 2 Edition Board.
- Jürgen R., Paul .S., Ulrike S., and Reinhard S. (2009).** Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial, Antifungal, Antiviral, and Cytotoxic Properties– an Overview: *Forsch Komplementmed.*16: 79–90.
- Kempf S. Zeitouni. (2009).** Coût biologique de la résistance aux antibiotiques: analyse et conséquences Pathologie Biologie : *article in press.*
- Khanbabae K and Ree T.R. (2001).** Tannins:Classification and Defenition. *Journal of Royal Society of Chemistry.* 18: 641-649.(cited in Djemai Zoueglache S, 2008).
- Khebir Souad, 2011 :** Etude chimique et biologique des huiles essentielles de trois *Artemisia*. Mémoire pour l’obtention du diplôme magister. Batna

Références bibliographiques

Khennouf Seddik, Iratni Nadjet, Baghiani Abderrahmane Harzallah Daoud and Talbi Mohammed, Ainane Tarik, Boriky Driss, Bennani Laila, Blaghen Mohammed and Arrar Lekhmici. 2010. Laboratory of Phytotherapy Applied to Chronic Diseases, laboratory of Applied Biochemistry, laboratory of Applied Microbiology, Department of Biology, Faculty of Science, University Ferhat Abbas, Setif, 19000,Algeria.

Khirdidine Hamida, 2013 : Comprimés de poudre de dattes comme support universelle des principes actifs de quelques plantes médicinales d'Algérie. Mémoire pour l'obtention du diplôme magister. Boumerdes

Kim T-H., Ito H., Hatano T., Taniguchi S., Khennouf S., Yoshida T. 2004. Chemical constituents of *Artemisia herba-alba* Asso., *Nat. Med.* **58** (4) : 165.

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

Koide, M., Furugen, M., Haranaga, S., Higa, F., Tateyama, M., Yamane, N., Fujita, J., 2008. Characteristics of *Legionella pneumophila* serogroup 2 strains by colony morphology. *Jpn. J. Infect. Dis.* **61**:487-489.

Kundan S-B., Anupam S. 2011. The Genus *Artemisia*: A Comprehensive Review. *Pharmaceutical Biology.*, **49** (1) : 101-109.

Larper JP., Larper Gourgaud M. 1997. Mémento technique de microbiologie. «3^{ème} ed : Tec Doc, Lavoisier. P 323, 563.

Lopes-Lutz D., Alviano D., Alviano C. S. and Kolodziejczyk P.P. (2008). Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochemistry.* **69**:1732-1738.

Lugasi A., Hovari J., SagiK., and Biro L. (2003). The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases.*J.Acta.biologica. szegediensis.* **47 (1-4)**:119-125.(Cited in Mohammedi Z, 2005)

Lutge U., Kluge M., Bauer G. (2002). Botanique 3^{ème} Ed : Technique et documentation. Lavoisier .Paris. 211p.

Maataoui, B. S.; Hmyene, A.; Hilali, S., Lebanese Science Journal, 2006, 7, 3-8.

Mahmoudi S., Khali M. et Mahmoudi N. (2013). Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynarascolymus* L.). *Nature et Technologie.*, 09 : 35-40.

Références bibliographiques

Makkar H., 2003- Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin rich feeds. *Ruminant research*, 49: 241-256.

Marco J.A. (1989). Sesquiterpene lactones from *Artemisia herba-alba*. *Phytochemistry*, **28**: 3121-3126.

Marco J-A., Sanz-Cervera J-F., Ocete G. 1994. New germacranolides and Eudesmanolides from north African *Artemisia herba-alba*. *J. Nat. Prod.*, **57** (7) : 939-946.

Marrif H. I., Ali B. 11., Hassan K. M. (1995). Some pharmacological studies on *Artemisia herba alba* (Asso.) in rabbits and mce. .k»wnal OEFEthnopharmacology 49,51 55.

Matkowski A., Tasarz P. and Szypula E. (2008). Antioxidant activity of herb extracts from five medicinal plants from *Lamiaceae*, subfamily *Lamioideae*. *Journal of Medicinal Plants Research*, **2** (11): 321-330.

Mbaye Dieng M. 2007. Etude phytochimique et activité antifongique des feuilles de *Borassus aethiopicum* Mart (Arecaceae). Mémoire de Maîtrise en Sciences naturelles. Faculté des Sciences et techniques. DEA de Chimie et Biochimie des produits naturels. Université Cheikh Anta Diop de Dakar. 69 P, pp 41-42.

Mighri, H.; Hajlaoui, H.; Akrouf, A.; Najjaa, H.; Neffati, M.; *Compts Rendus Chimie*, **2010**, *13*, 380-386

Mohamed A-H-H., El-Sayed M-A., Hegazy M-E., Helaly S-E., Esmail A-M., Mohamed N-S. 2010. Chemical Constituents and Biological Activities of *Artemisia herba-alba*. *Rec. Nat. Prod.* **4** (1) : 1-25.

Mouhajir F., Pedersen J-A., Rejdali M., Touer S-G-H-N. 2001. Phenolics in Moroccan medicinal plant species as studied by electron spin resonance spectroscopy. *Can Pharmaceutical Biology.*, **39** (5) : 391-398.

Molyneux P. (2004). The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl(DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin. *Journal of Science and Technology.*, **26** (2): 211-219.

Moreira M.R., Ponce A.G., Del Valle C.E. et Roura S.I. (2005). Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT- Food Science and Technology.*, **38**: 565-570.

Murray PR., Pfailler MA., Tenove FC. 1999. Manual of clinical microbiology. 7^{ème} ed: ASM press.P 572-585.

Références bibliographiques

- Muselli A. 2010.** Chemical variability of *Artemisia herba-alba* Asso essential oils from East Morocco. *Chemical Papers.*, **64** (5) : 550-556.
- Nabli. Ma. 1989.** Essai de synthèse sur la végétation et la phyto-écologie tunisiennes. Tome 1. Ed MAB (faculté des sciences de Tunis) : 186-188 p.
- Narayana K., Reddy M., Chaluvadi M., Krishna D., 2001-** Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian journal of pharmacology*, 33: 2-16.
- Obame, L.-C.; Koudou, J.; Chalchat, J.-C.; Bassolé, I.; Edou, P.; Ouattara, S. A.; Traore, S.A., Scientific Research, 2007, 2(11), 491-495.**
- Paolini J., El Ouariachi E-M., Bouyanzer A., Hammouti B., Desjobert J-M., Costa J., Vernin G., Parkanyi C. 2001.** GC/MS analysis of *Artemisia herba-alba* Asso. From Algeria, Nonpolar and polar extracts. *Riv. Ital. EPPOS.*, **32** : 3-16.
- Paris M et Hurabielle. (1981).** Abrégé de matière médicale. Pharmacognosie. Tome 1. Ed Masson. Paris.pp: 102-103-104-107.
- Pascale S., Veronique C., 2006-** Les polyphénols en agroalimentaire. (Edition TEC & DOC) Lavoisier: 2.
- Perchellet M., Moutaseb U., Makkar H., Perchellet P., 1996-** Ability of tumor promotion in mouse skin *in vivo*. *Int. J. Oncol.*, 9 :801-809.
- Popovici, C.; Saykova, I.; Tylkowski, B., Revue de génie industriel, 2009,4, 25-39.**
- Pouget. M.** Les relations sol-végétation dans les steppes. *Trav. Doct. Deorstom*, 19890, 556p.
- Quezel P., Santa S. 1962.** Nouvelle Flore de l'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales. Editions du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, Tome I. 565 p.
- Ramezania, M. , Fazli-Bazzaza B.S., Saghafi-Khademb F. and Dabaghiana A. (2004).** Antimicrobial activity of four *Artemisia* species of Iran. *Fitoterapia*. **75** : 201–203.
- Rira M., 2006-** Effet des polyphénols et des tanins sur l'activité métabolique du microbiote ruminal d'ovins. Mémoire de Magister en biochimie et microbiologie appliqué. Univ. Mentouri de Constantine: 14.
- Rubin L, Levey I. 1998.** *L.pneumophila* in neonates. A literature review *J.Perinatal*. Vol. 18. N°2. P287-290.
- Salah S.M. and Jager A.K. (2005).** Screening of traditionally used Lebanese herbs for neurological activities. *J Ethnopharmacol*, **97**: 145–149.
- Saleh N.A.M., El-Negoumy S.I. and Abou-Zaid M.M. (1987).** Flavonoids of *Artemisia judaica*, *A. monosperma* and *Artemisia herba-alba*. *Phytochemistry*, **26**: 3059–3064.

Références bibliographiques

- Salhi, 2012:** Allelochemicals from some medicinal and aromatic plants and their potential use as bioherbicides. P 39
- Salido S., Valenzuela L-R., Altarejos J., Nogueras M., Sanchez A., Cano E. 2004.** Composition and infraspecific variability of *Artemisia herba-alba* from southern Spain. *Biochemical Systematics and Ecology.*, **32** : 265-277.
- Sanchez-Moreno C., Larrauri J.A., et Saura-calixto F. (1998).** A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal Science Technology International.* 8, 121-137.
- Sanz J-F., Castellano G., Marco J-A. 1990.** Sesquiterpene lactones from *Artemisia herbaalba*. *Phytochemistry.*, **29** (2) : 541-545.
- Saoudi M., Allagui M.S., Abdelmouleh A., Jamoussi K., and El Feki A. (2010).** Protective effects of aqueous extract of *Artemisia campestris* against puffer fish *Lagocephalus lagocephalus* extract-induced oxidative damage in rats. *Exp.Tox.Pathol.***62**: 601–605.
- Scheachter., Medoff., Eisenstein. 1999.** Microbiologie et pathologie infectieuse. 2^{ème} ed. P307-315.
- Segal R., Feuersteint I., Danin A. 1987.** Chemotypes of *Artemisia herba-alba* in Israel Based on Their Sesquiterpene Lactone and Essential Oil Constitution. *Biochemical Systematics and Ecology.*, **15** (4) : 411-416.
- Singleton P. 1999.** Bactériologie. 4^{ème} ed :Dunod, Paris. P271.
- Singleton V.L. et Rossi J.A (1965)** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Technology and Viticulture.* 16, 144-153.
- Sofia S., Luis R., Joaquin A, Eusebio C., (2004).** Composition and infraspecific variability of *Artemisia herba-alba* from S.outhern Spain. *Biochemical systematics and Ecology.* 32: 265-277.
- Tantaoui-Elaraki, A.; Ferhout, F.; Errifi, A., J. Essent. Oil Res., 1993, 5, 535-545.**
- Tapiero H., Tew K.D., Nguyen B.G., and Mathé G. (2002).** Polyphenol do they play a role in the prevention, of the human pathologies? *Biomed.pharmacother.* **56**: 200-207. (cited in DjemaiZoueglache S, 2008). *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 55: 58-774.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency), 1985.** *Legionella* : Human Health Criteria Document. Office of Science and Technology, Office of Water, Washington, DC.123.
- Vernin G., Merad L-O. 1994.** Mass spectra and Kovats indexes of some new *cischrysanthenyl* esters found in the essential oil of *Artemisia herba-alba* from Algeria. *J.*

Références bibliographiques

- Essen. Oil Res.*, **6** : 437-338.
- Vernin G., Merad O., Vernin G-M., Zamkotsian R-M., Parkanyi C-D. 1995.** GC/MS analysis of *Artemisia herba-alba* Asso essential oils from Algeria. *Develop. in food Sci.*, **37** : 147-205.
- Vernin G., Parkanyi C. 2001.** GC/MS analysis of *Artemisia herba-alba* Asso. From Algeria, Nonpolar and polar extracts. *Riv. Ital. EPPOS.*, **32** : 3-16.
- Wan J., Wilcock A., and Coventry M.J. (1998).** The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonashydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. *J. Appl. Microbiol.* **84**:152-158.
- Wilfred .V et Ralph .N. (2006).** Phenolic compound biochemistry Ed Springer .USA. 24p.
- Yun Shen, Liang Jin, Peng Xiao, Yan Lu, Jinsong Bao., 2009.** Total phenolics, flavonoids, antioxidant capacity in rice grain and their relations to grain color, size and weight, *J of Cereal Sci.* **49**: 106-111.
- Zouari1S., Zouari N, Fakhfakh N, Bougatef A., Ayadi M. A. and Neffati1 M. (2010).** Chemical composition and biological activities of a new essential oil chemotype of Tunisian *Artemisia herba alba* Asso. *J. of Med. Plants Res.* **4(10)**:871-880.

Site internet :

WWW.microbiologybook.org.

WWW.techmicrobio.eu.

Annexes

Annexe 1 :

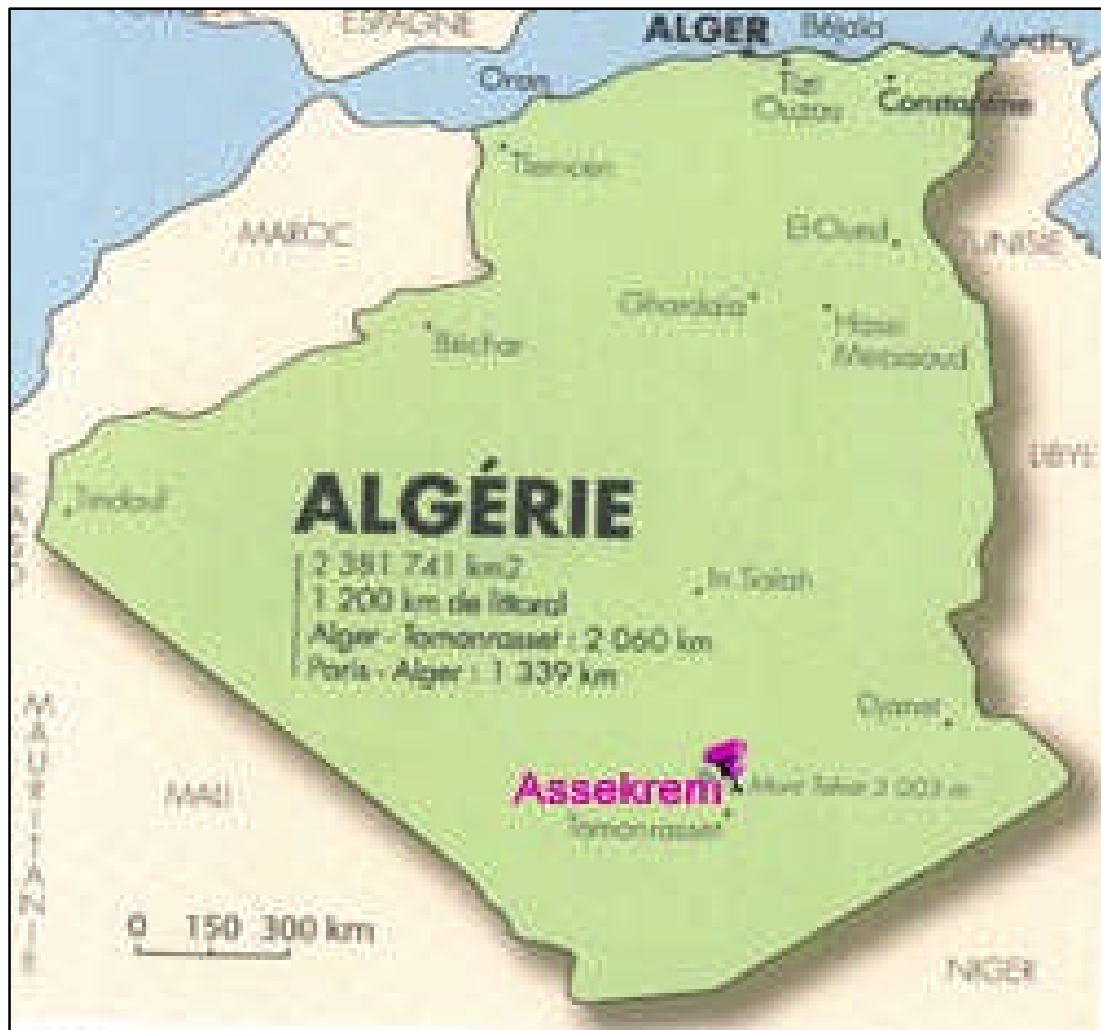


Figure 01: La région d'Assekrem de la wilaya de Tamanrasset (Algérie)

Annexes 2 :

Verreries et appareillage

Tableau I: Appareillage, verrerie et autres matériel utilisés

Appareillage	Verrerie et autres matériel
<ul style="list-style-type: none"> - Autoclave (PBINTERNATIONAL) ; - Bain Marie (MEMMERT) ; - Balance de précision 0,01 mg (SARTORIUS) ; - Centrifugeuse réfrigérée (SIGMA 3-18K) ; - Etuve (MEMMERT) ; - Réfrigérateur (ENIEM); - Spectrophotomètre (SCHIMADZU). 	<ul style="list-style-type: none"> - Anse à boucle ; - Boîtes de pétri en plastique à 90 mm de diamètre ; - Coton ; - Ecouvillon ; - Entonnoir ; - Erlen-Meyers ; - Eprouvettes graduées ; - Flacons stériles ; - Micropipettes (de 10µl à 1000µl) ; - Papier aluminium ; - Tubes à essai stériles ; - Tubes ECBU ; - Papier wattman.

Composition des solutions et milieux de culture utilisés

- **Eau physiologique stérile** (composition en g/l)
- Chlorure de sodium(NaCl).....9g.
- Eau distillée.....1000ml.
- pH=7.
- stérilisation à 120°C/15min.
- **Préparation de la solution de carbonate de sodium (Na₂CO₃) 7%**
- Dissoudre 7g dans un volume de 100ml d'eau distillée.
- **Préparation de la solution de (AlCl₃) à 10%**
- Dissoudre 10g dans un volume de 100ml d'eau distillée.
- **Préparation de la solution du chlorure de fer (FeCl₃) 0.1%**
- Dissoudre 0.1g dans un volume de 100ml d'eau distillée.

Annexes

- **Préparation de l'acide trichloracétique (TCA) à 10%**
- Dissoudre 10g dans un volume de 100ml d'eau distillée.
- **Préparation de ferrocyanure $K_3Fe(CN)_6$ à 1%**
- Dissoudre 10g dans un volume de 100ml d'eau distillée.
- **Préparation de la solution saturée de CO_3Na_2**
- Dissoudre 43.75g de carbonate de sodium dans 100ml d'eau distillée chaude (70° à 80°C), après refroidissement la solution est filtrée puis ajustée à 125ml.
- **Préparation de la solution du DPPH**
- Dissoudre 2,5mg de la poudre DPPH dans 100ml de méthanol.
- **Préparation du tampon phosphate pH = 6.6**
- Préparé par un mélange de (65ml+300µl) de solution A + (34ml+700µl) de solution B ou la solution A (0.9073g de KH_2PO_4 dans 100ml d'ED) et la solution B (0.5935g de Na_2HPO_4 dans 50ml d'ED).

- **Gélose Mueller Hinton** (composition en g/l)
- Extrait de viande3g
- Amidon1,5g
- Hydrolysate acide de caséine17,5g
- Agar.....18g
- pH = 7,4

- **Gélose PCA** (*Plate Count Agar*, en anglais) (composition en g/l)
- Tryptone.....6,0 g
- Extrait de levure..... 2,5 g
- Glucose.....1,0 g
- Agar.....15,0 g
- pH = 7

- **Gélose chapman** (composition en g/l)
- Peptone :.....10,0 g
- Extrait de viande de bœuf :.....1,0 g
- Chlorure de sodium :.....75,0 g
- Mannitol :.....10,0 g

Annexes

- Rouge de phénol :.....0,025 g
- Agar-Agar :.....15,0 g
- pH = 7,4
- **Gélose SS (Salmonella-Shigella) (g/l)**
- Peptone pancréatique de viande5,0 g
- Extrait de viande5,0 g
- Lactose10,0 g
- Sels biliaires.....8,5 g
- Citrate de sodium.....10,0 g
- Thiosulfate de sodium.....8,5 g
- Citrate ferrique ammoniacal.....1,0 g
- Rouge neutre25,0 mg
- Vert brillant.....0,33 mg
- Agar agar bactériologique.....15,0 g
- pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,0 ± 0,2.
- **Gélose VRBG (g/l)**
- Extrait de levure..... 3,0g
- Peptone..... 7,0g
- Chlorure de sodium5,0g
- Sels biliaires..... 1,5g
- Glucose..... 10,0g
- Rouge neutre..... 0,03g
- Cristal violet..... 0,002g
- Agar..... 12,0g
- pH 7,4 ± 0,2
- **Gélose VRBL (g/l) (Milieu lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre)**
- Peptone..... 7 g
- Extrait de levure..... 3 g
- Lactose..... 10 g
- Chlorure de sodium..... 5 g

Annexes

- Mélange sel biliaire..... 1,5 g
- Cristal violet..... 0,002 g
- Rouge neutre..... 0,03 g
- Agar-agar..... 15 g
- pH 7,4
- **Gélose Désoxycholate (g/l)**
- Peptone..... 10,0 g
- Citrate de sodium..... 1,0 g
- Lactose..... 10,0 g
- Rouge neutre..... 0,03 g
- Désoxycholate de sodium..... 1,0 g
- Chlorure de sodium..... 5,0 g
- Hydrogénophosphate de potassium..... 2,0 g
- Agar..... 13,0 g
- pH = 7,3
- **Gélose à ADN**
- Tompon Tris pH 9 (0.05 M).....1000ml
- ADN.....0.3g
- Solution de Bleu de toluidine (0.1 M).....3ml
- Solution de chlorure de calcium (CaCl₂) (0.01 M).....1ml
- Chlorure de sodium (Nacl).....10g
- Agar-agar10g
- pH = 8,6
- **Bouillon Nutritif**
- Peptone5,00g
- Extrait de viande..... 3,00g
- pH final à 25°C : 6,8 ± 0,2

Annexe 3 :



Figure 02 : Aspect de filtrat de l'extrait d'*Artemisia herba alba*.

Annexe 4 :

- ❖ **Dilution à partir de la solution mère :** pour avoir des solutions diluées à partir d'une solution mère appliquer la règle :

$$(C_1 V_1 = C_2 V_2)$$

C₂ : concentration de la solution diluée que l'on veut préparer.

V₂ : le volume connu de la solution diluée.

C₁ : concentration de la solution mère.

V₁ : le volume inconnu de la solution mère qu'il faut prélever et ajuster avec de l'eau distillée pour avoir une concentration finale.

Annexe 5 :

- **Résultats du dosage des polyphénols totaux**

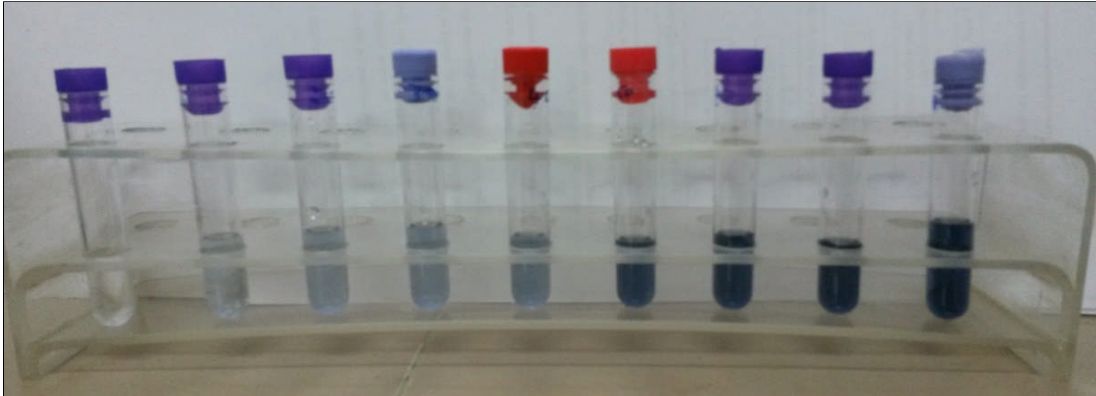


Figure 03 : L'acide gallique.

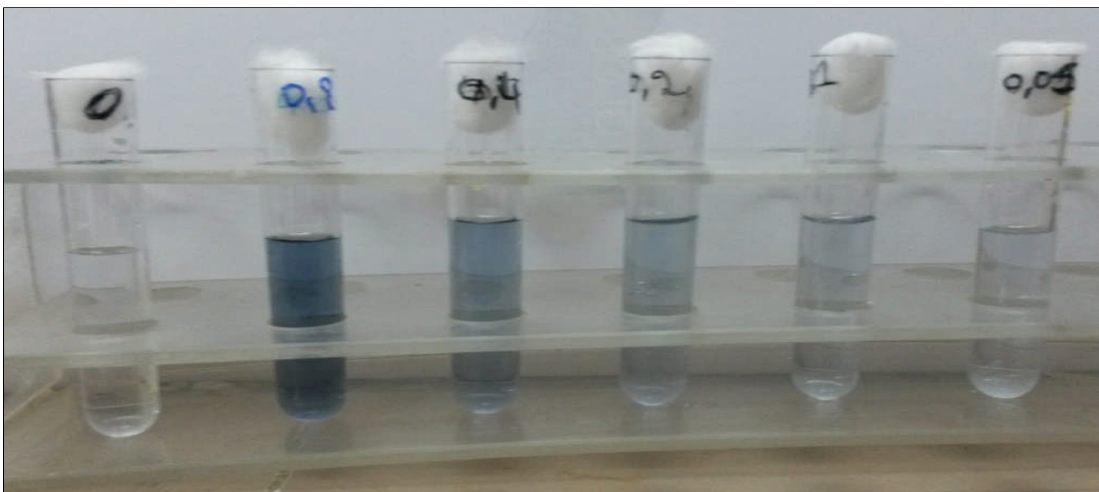


Figure 04 : Extrait aqueux.

Annexe 6 :

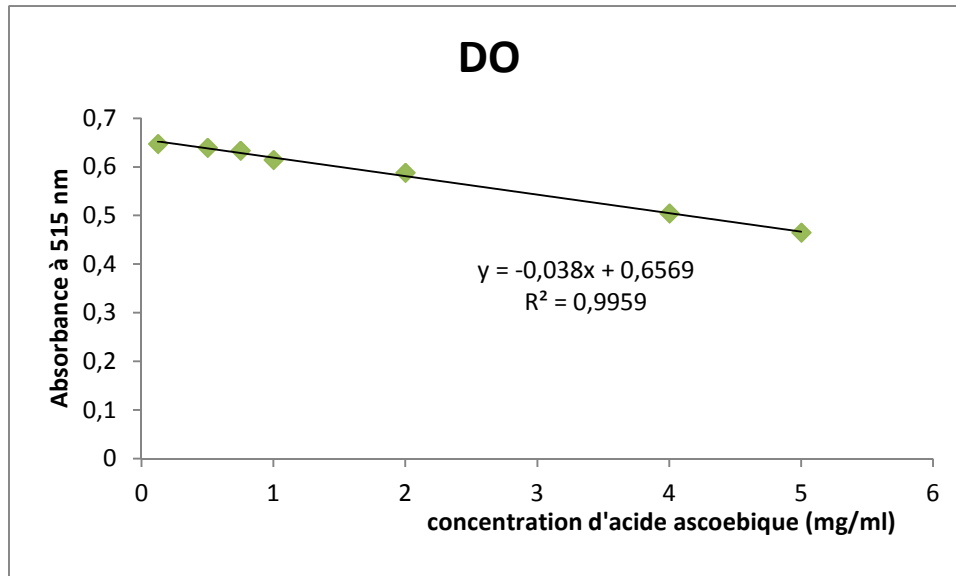


Figure 05 : Courbes de régression de l'activité antioxydante qui a servi au calcul de % d'inhibition du DPPH de l'acide ascorbique.

Annexe 7 :

- Caractère morphologique
 - La morphologie des colonies bactériennes



Figure 06 : L'aspect des colonies d'*E. coli* ATCC 25922 dans des différents milieux (VRBL, Désoxycholate, VRBG).

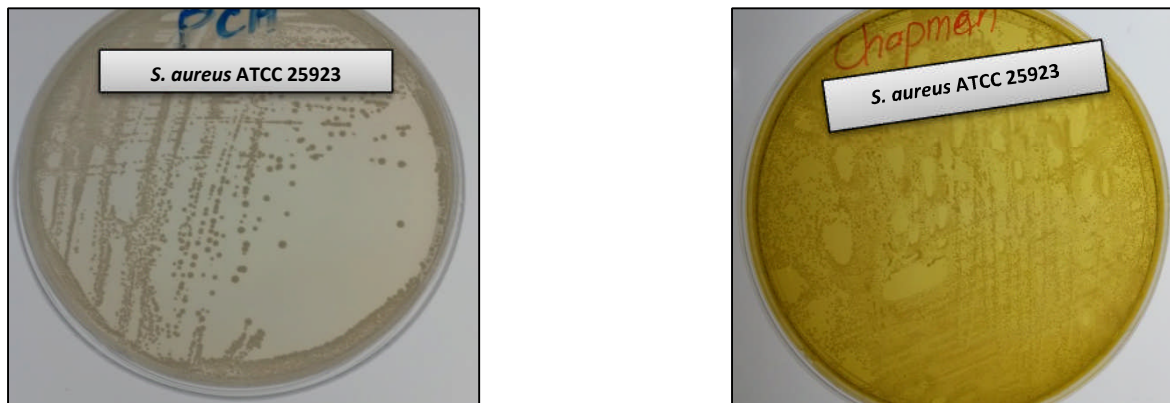


Figure 07 : L'aspect des colonies de *S. aureus* ATCC 25923 sur deux milieux (PCA, Chapman).

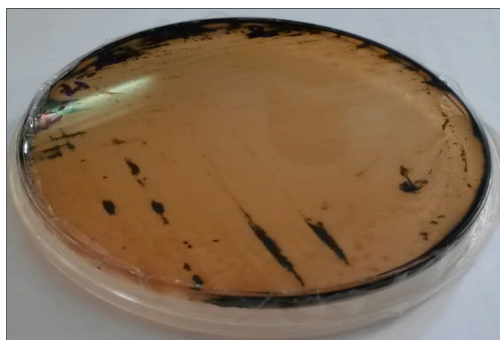


Figure 08 : *Salmonella* sur milieu spécifique SS.

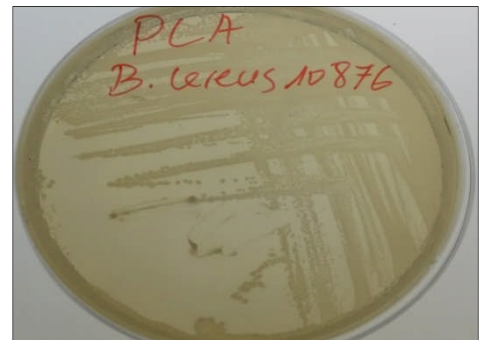


Figure 09 : *Bacillus Cereus* ATCC 10876 sur milieu PCA.

Annexes



Figure 10 : L'aspect des colonies de *Klebsiella pneumoniae* 1766 sur des milieux différents (PCA, Désoxycholate, VRBL).

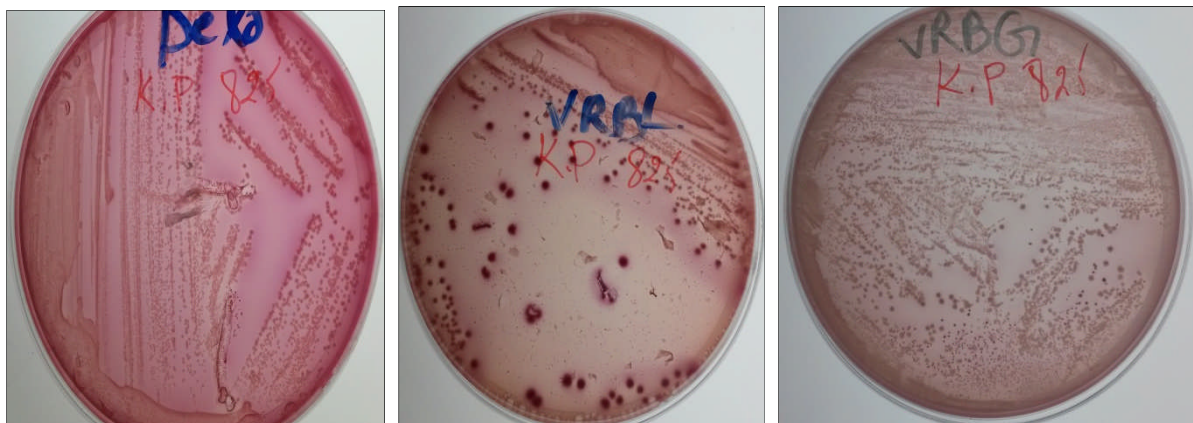


Figure 11 : L'aspect des colonies de *Klebsiella pneumoniae* 825 sur des milieux différents (Désoxycholate, VRBL, VRBG)



Figure 12 : L'aspect des colonies de *Klebsiella pneumoniae* 4352 sur des milieux différents (PCA, Désoxycholate, VRBL).

Annexe 8 :

➤ Coloration de Gram

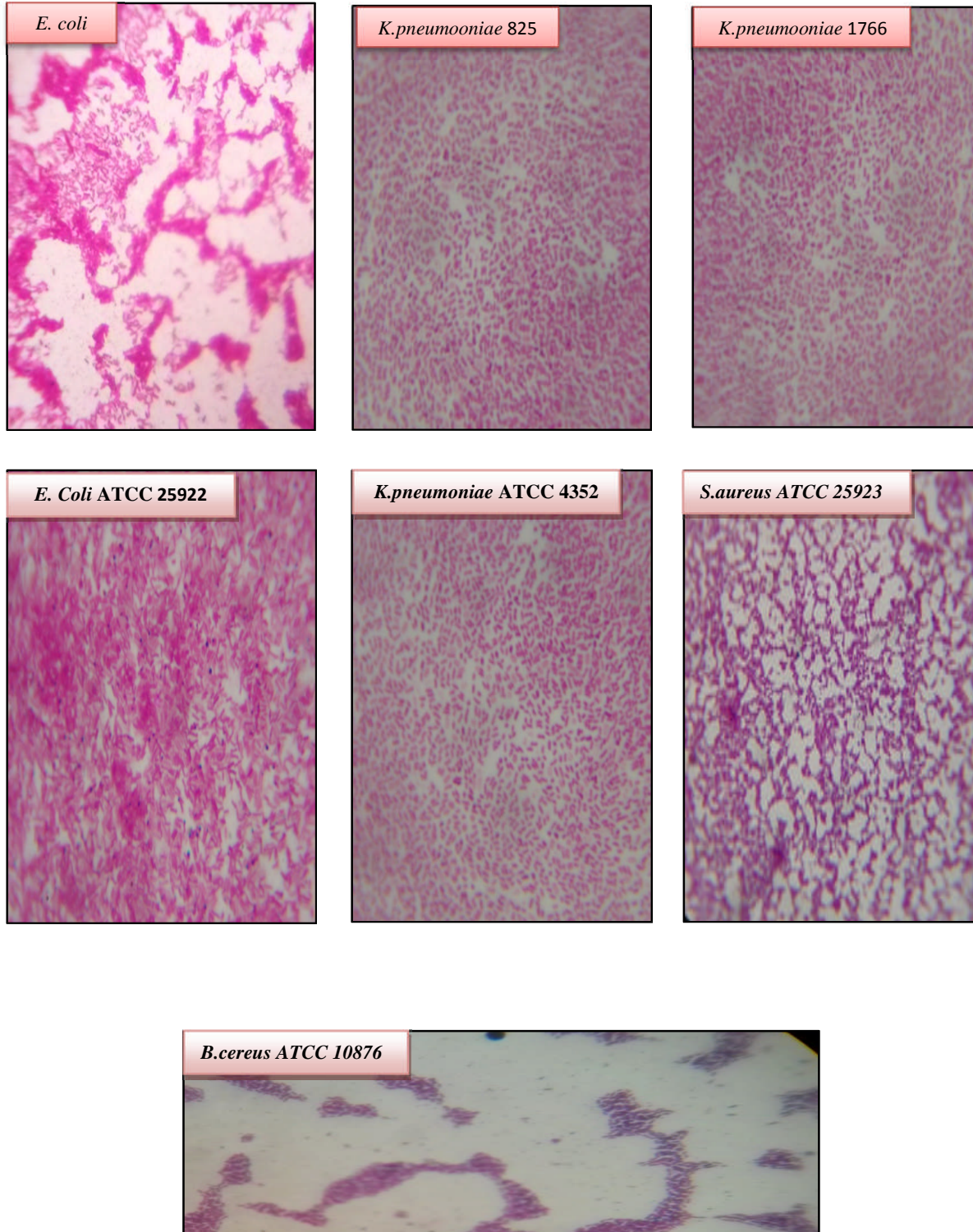


Figure 13 : Coloration de Gram à l'objectif $\times 100$ à l'immersion.

Annexes

Annexe 9 :

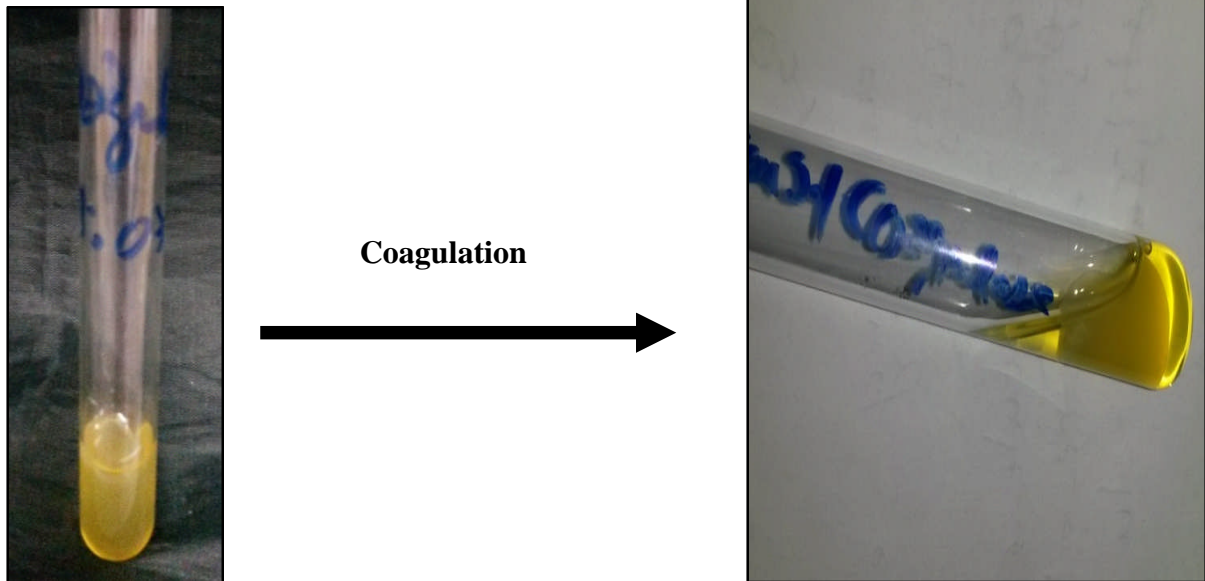
➤ L'aspect des galeries API 20E



Figure 14 : L'aspect des galeries contenant (*E.Coli*, *K.pneumoniae* 4352, *K.pneumoniae* 1766, *K.pneumoniae* 825) après incubation.

Annexe 10 :

➤ Test du coagulase



Avant

Après

Figure 15 : Souche coagulase libre avec une orientation vers *Staphylococcus aureus*.

Annexe 11 :

➤ Test d'ADNase

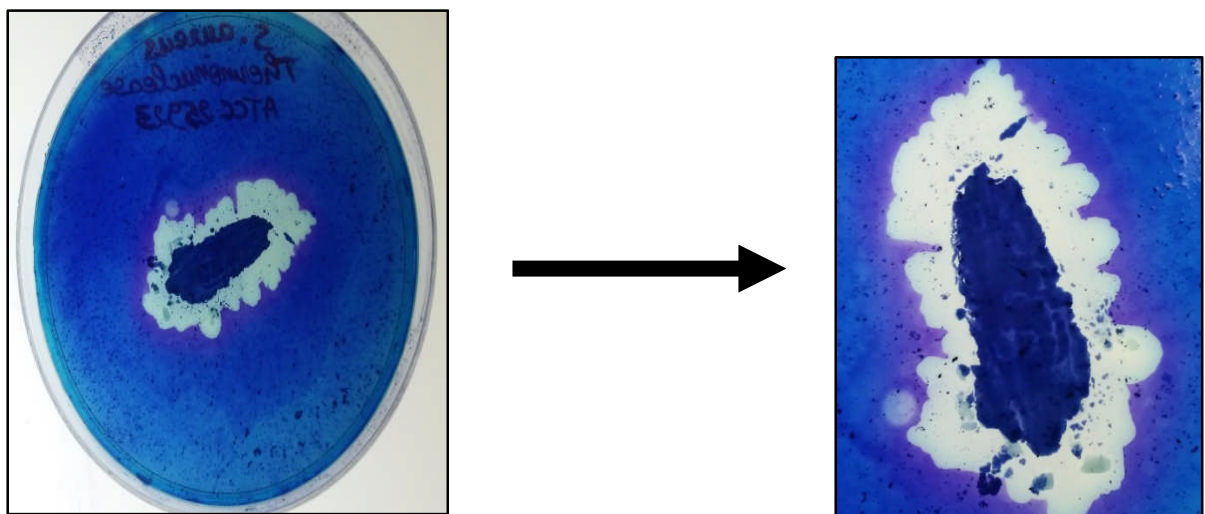


Figure 16 : Présence d'une ADNase thermorésistante caractéristique de l'espèce *S.aureus*.

Annexe 12 :

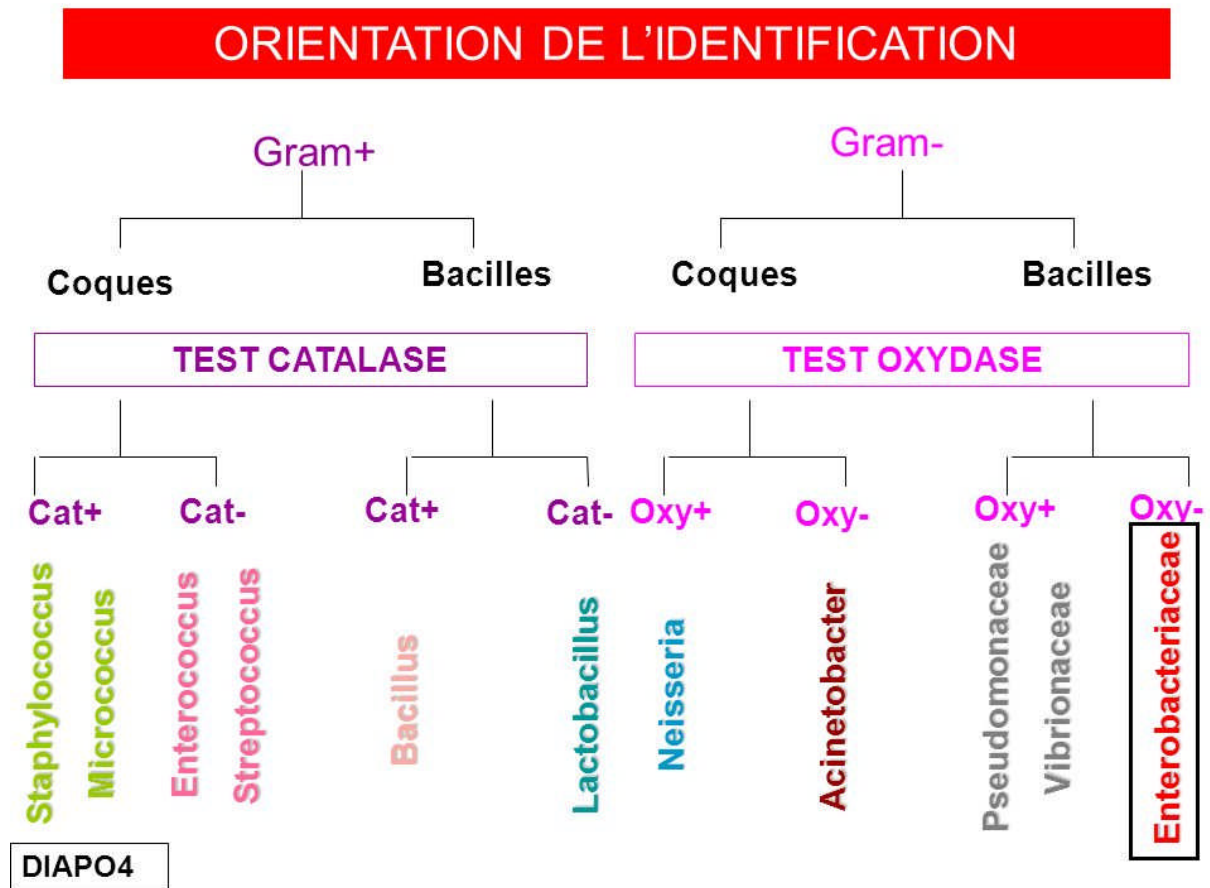


























Figure 12 : schéma de l'orientation pour l'identification des souches.

Annexes

Annexe 13 :

Tableau II : Tableau de lecture de la galerie API 20E.

TABEAU DE LECTURE DE LA GALERIE MINIATURISÉE API 20E						
Microtube	Substrat :	Caractère recherché :	Révélateur	Lecture directe ou indirecte Test (si nécessaire)	Résultat -	Résultat +
ONPG	ONPG = Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	Beta galactosidase		Lecture directe		
ADH LDC ODC	Arginine Lysine Ornithine	Arginine Dihydrolase Lysine Décarboxylase Ornithine Décarboxylase	Rouge de Phénol	Lecture directe		
[CIT]	Citrate	Utilisation du citrate	BBT	Lecture directe		
H ₂ S	Thiosulfate de sodium	Production d'H ₂ S		Lecture directe		
URÉ	Urée	Uréase	Rouge de Phénol	Lecture directe		 
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase		Lecture indirecte Ajouter une goutte de réactif chlorure de fer III		
IND	Tryptophane	Tryptophanase ou production d'indole		Lecture indirecte Ajouter une goutte de réactif Kovacs	 	 
[VP]	Pyruvate de sodium	production d'acétoïne (3-hydroxybutanone)		Lecture indirecte Ajouter 1 goutte de VP1 et VP2 Attendre 10 minutes		 
[GEL]	Gélatine	gélatinase		Lecture directe		
GLU à ARA = zymogramme	Substrat carboné (glucide)	Utilisation de substrats carbonés (glucides)	BBT	Lecture directe		
NO ₂ / N ₂	Nitrates (NO ₃ ⁻)	Nitrate réductase		Lecture indirecte Ajouter 1 goutte de NIT1 et NIT2 et zinc éventuellement	