

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou



Faculté des Science Biologique et des Sciences Agronomiques

Département de Biochimie et Microbiologie

Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master en Biotechnologie

Spécialité : Biotechnologie et Valorisation des Plantes

Aristolochia longa : Phytochimie, polyphénols
et évaluation de l'activité antibactérienne

Présenté par :

AIT TAYEB Zohra

Soutenu publiquement le 27 Février 2020 devant le jury composé de :

M^{me} ASMANI K.	UMMTO	MCB	Président du jury
M^{me} AFIF CHAOUCHE T.	UMMTO	MCB	Promotrice
M^{me} NAIT KACI M.	UMMTO	MCA	Co-promotrice
M^{me} OUSSAID S.	UMMTO	MCB	Examinatrice

Année universitaire : 2019/2020

Remerciements

*Je tiens à exprimer ma profonde gratitude, et mon vif remerciements à **Melle Asmaní K.** de m'avoir fait l'honneur de présider mon honorable jury.*

*C'est avec un très grand plaisir que je remercie infiniment ma promotrice **Mme AFIF CHAOUCHE T.** de m'avoir donné la chance de travailler sous sa direction.*

*Je tiens à remercier ma Co-promotrice **Mme NAIT KACI M.** pour le temps et l'attention qu'elle a bien voulu consacrer au bon déroulement de ce travail.*

*Un grand merci s'adresse également à **Melle Oussaïd S.** d'avoir accepté d'examiner mon modeste travail.*

Enfin, je remercie les ingénieurs du laboratoire de microbiologie pour leurs aides et pour leurs encouragements.

Dédicaces

*Je dédie ce modeste travail à toutes les personnes que
j'aime :*

*Mes très chers parents à qui je dois le mérite d'être
arrivée là, qu'ils trouvent ici l'expression de ma
profonde gratitude et mon affection.*

Mon très cher mari Hakim

Mes très chers sœurs Taous et Fairouz

Mon très cher frère Hocine

Ma très chère belle famille

Toute ma famille et les amis(es)

Toute l'équipe du laboratoire Microbiologie

*Toute la promotion Biotechnologie et valorisation des plantes
2019/2020.*

Liste des figures

Figure 01 : <i>Aristolochia longa</i> L	3
Figure 02 : Structure d'acide aristolochique.....	4
Figure 03 : Distribution de la famille des <i>Aristolochiaceae</i> dans le monde.....	6
Figure 04 : Structure chimique de l'acide benzoïque	7
Figure 05 : Structure chimique de l'acide cinnamique.....	8
Figure 06 : Structure de base des flavonoïdes	8
Figure 07 : Structure chimique d'un tanin hydrolysable	9
Figure 08 : Structure chimique d'un tanin condensé.....	10
Figure 09 : Structure de la molécule d'isoprène.....	10
Figure 10 : Structure des alcaloïdes	11
Figure 11 : Schéma récapitulatif de la procédure d'extraction des polyphénols.....	17
Figure 12 : Schéma du test antimicrobien	22
Figure 13 : Aspect de l'extrait obtenu	24
Figure 14 : Exemples d'aspects macroscopiques des isolats cultivés sur GN.....	27
Figure 15 : Observation microscopique de la coloration de Gram (x 100).....	28
Figure 16 : Répartition des souches selon leur Gram.....	31
Figure 17 : Aspect macroscopique de <i>Bacillus cereus</i> sur le milieu gélose de Mossel	32
Figure 18 : Effet antibactériens de quelques souches.....	35

Liste des tableaux

Tableau 01 : Classification des souches bactériennes étudiées	14
Tableau 02 : Milieux de culture utilisés	16
Tableau 03 : Différents produits chimiques et leurs utilisations	16
Tableau 04 : Poids de l'extrait et le rendement d'extraction des composés phénoliques de la plante <i>A.longa</i>	24
Tableau 05 : Caractéristiques des principaux germes étudiés	27
Tableau 06 : Caractères cultureux des souches	28
Tableau 07 : Résultats de la coloration de Gram.....	31
Tableau 08 : Résultats des tests biochimiques obtenus pour les isolats des <i>Staphylococcus aureus</i>	33
Tableau 09 : Diamètre des zones d'inhibitions des échantillons testés.....	36

Remerciement

Dédicaces

Liste des figures

Liste des tableaux

Sommaire

Résumé

Introduction 1

Synthèse bibliographique

I. La plante étudié et les métabolites secondaires	3
I.1. <i>Aristolochia longa</i>	3
I.1.1. Description botanique	3
I.1.2. Origine et distribution	3
I.1.3. Classification botanique	4
I.1.4. Phytochimie	4
I.1.5. Usage médicinale	5
I.2. Généralité sur la famille Aristolochiaceae	5
I.2.1. Distribution et habitat.....	5
I.2.2. Phytochimie du genre <i>Aristolochia</i>	6
I.3. Métabolites secondaires	6
I.3.1. Définition	6
I.3.2. Principales classes de métabolites secondaires	7
I.3.2.1.Composés phénoliques.....	7
I.3.2.1.1. Acides phénoliques	7
I.3.2.1.1.1. Acide phénoliques dérivés d'acide benzoïque	7
I.3.2.1.1.2. Acides phénoliques dérivés d'acide cinnamique	8
I.3.2.1.2. Flavonoïdes	8
I.3.2.1.3. Tanins.....	9
I.3.2.1.3.1. Tanins hydrolysables.....	9
I.3.2.1.3.2. Tanins condensés	9
I.3.2.2. Terpénoides	10
I.3.2.3. Alcaloïdes.....	11
I.3.3. Biosynthèse des polyphénols	12

I.3.4. Propriétés des composés phénoliques	12
I.3.4.1. Propriétés physico-chimiques	12
I.3.4.2. Propriétés biologique	12
I.4. Activité antimicrobienne	12
II. Lait de vache cru et contaminants	13
II.1. Lait de vache cru	13
II.2. Dangers de la contamination du lait	13
II.3. Description des microorganismes étudiés	14

Matériel et méthodes

I. Matériel	15
I.1. Matériel biologique	15
I.1.1. Récolte	15
I.1.2. Matériel non biologiques	16
I.1.3. Milieux de cultures	16
I.1.4. Produits chimiques	16
2. Méthodes	16
2.1. Echantillonnage	17
2.2. Extraction des polyphénols totaux	18
2.3. Analyse phytochimique	18
2.4. Dosage des polyphénols	19
2.5. Recherche, Isolement et purification des microorganismes	19
2.6. Identification phénotypiques des souches	20
2.6.1. Caractérisation morphologique des isolats	20
2.6.1.1. Aspect macroscopique des colonies	20
2.6.1.2. Aspect microscopique	21
2.6.1.3. Caractères biochimique	21
2.6.1.3.1. Pour les <i>Staphylococcus sp</i>	22
2.6.1.3.2. Pour les <i>Bacillus cereus</i>	22
2.7. Etudes de l'activité antimicrobienne	23

Résultats et discussion

1. Caractéristique de l'extrait	25
2. Taux d'extraction	25
3. Dosage des polyphénols totaux	26
4. Analyse phytochimique des substances polyphénoliques	27
5. Isolement des souches	27
6. Purification des souches	28
7. Caractérisations phénotypiques des isolats	28
7.1. Examen macroscopique des isolats	29
7.2. Examen microscopique des isolats	31
8. Identification des <i>Bacillus sp</i> et <i>Staphylococcus sp</i>	32
8.1. Identification des <i>Bacillus sp</i>	32
8.2. Identification des <i>Staphylococcus sp</i>	34
9. Activité antimicrobienne	36
Conclusion et perspectives	39
Références bibliographique	40
Annexes	

Résumé

Aristolochia longa est un arbuste qui appartient à la famille des *Aristolochiaceae*, cette espèce connue sous le nom de « Belrostom » est très répandue dans le sud Algérien. C'est une plante médicinale largement utilisée en médecine traditionnelle à des fins thérapeutiques à cause de sa richesse en composés actifs. Cela nous a conduits à l'extraction des composés phénoliques à partir de ses feuilles avec le méthanol-acide formique. Le dosage des polyphénols totaux a montré une meilleur teneur de 1,0422 mg EAG/g et le screening phytochimique a montré la présence des tannins totaux et des flavonoïdes.

La recherche de souche de *Staphylococcus aureus* et celles de *Bacillus cereus* dans le lait de vache cru, leur caractérisation et l'étude de l'activité antimicrobienne de l'extrait d'*Aristolochia longa*.

Ces souches ont montré une sensibilité à l'extrait méthanoïque avec des zones d'inhibition de 7 à 19 mm chez les bactéries *Staphylococcus aureus* qui est très sensible. Par contre, les souches *Bacillus cereus* sont révélées moins sensibles avec une zone d'inhibition allant de 9 à 15 mm.

Mots clés : *Aristolochia longa*, Polyphénols, activité antimicrobienne.

Abstract

Aristolochia longa is a shrub that belongs to the *Aristolochiaceae* family, this species known under the name of "Belrostom" is very popular in southern Algeria. It is a medicinal plant widely used in traditional medicine for therapeutic purposes because of its rich in active compounds. This led to the extraction of phenolic compound from its leaves with methanol-formic acid. The determination of the total polyphenols showed a better content of 1.0422 mg EAG / g and the phytochemical screening showed the presence of total tannins and flavonoids.

The search for *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* strains in raw cow's milk, their characterization, and the study of the antimicrobial activity of *Aristolochia longa* extract.

These strains showed sensitivity to the methanoic extract with zones of inhibition of 7 to 19 mm in the bacteria *Staphylococcus aureus* which is very sensitive. In contrast, *Bacillus cereus* strains are found to be less sensitive with an inhibition zone ranging from 9 to 15 mm.

Keywords: *Aristolochia longa*, Polyphenols, antimicrobial activity.

ملخص

Aristolochia longa هي شجيرة تنتمي إلى عائلة *Aristolochiaceae* ، وهي شجيرة معروفة باسم "Belrostom" تحظى بشعبية كبيرة في جنوب الجزائر ، وهي نبات طبي يستخدم على نطاق واسع في الطب التقليدي للأغراض العلاجية. غني بالمركبات النشطة. أدى ذلك إلى استخلاص المركبات الفينولية من أوراقها باستخدام حمض الميثانول فورميك. أظهر تحديد إجمالي البوليفينول محتوى أفضل قدره 1.0422 مجم EAG / جم وأظهر الفحص الكيميائي النباتي وجود إجمالي العفص والفلافونويد.

البحث عن سلالات *Staphylococcus aureus* وسلالات *Bacillus cereus* في حليب البقر الخام وتوصيفها ودراسة النشاط المضاد للميكروبات لمستخلص *Aristolochia longa* ظهرت هذه السلالات حساسية لمستخلص الميثانولي مع مناطق تثبيط تتراوح من 7 إلى 19 ملم في بكتيريا *Staphylococcus aureus* شديدة الحساسية. من ناحية أخرى، تظهر سلالات *Bacillus cereus* أنها أقل حساسية مع منطقة تثبيط تتراوح من 9 إلى 15 ملم

الكلمات المفتاحية: *Aristolochia longa* ، Polyphenols ، النشاط المضاد للميكروبات

INTRODUCTION



Depuis longtemps, et malgré le progrès scientifique, la médecine traditionnelle demeure le recours principal des populations afin de traiter leurs problèmes de santé. Selon l'organisation mondiale de la santé, environ 80% des individus dépendent de la médecine traditionnelle dans les soins primaires dans la vie quotidienne (**Ladoh *et al.* , 2014**).

Parmi les plantes médicinales les plus utilisées, *Aristolochia longa*, qui est une plante médicinale appartient à la famille des *Aristolochiaceae*, ce genre d'espèce connue sous le nom de « Belrostom » qui est très répandue dans le sud algérien.

Les recherches ont montré que l'action des plantes médicinales est due à quelques constituants élaborés par la plante appelés « principes actifs » qui peuvent être des glycosides, des résines ou des polyphénols (**Fluck, 1977**).

Les composés phénoliques ou polyphénols sont des métabolites secondaires des végétaux. Permettant de résister aux diverses agressions. Ils participent de manière très efficace à la tolérance des végétaux à des stress variés. D'un point de vue thérapeutique, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve dans les plantes médicinales (**Macheix *et al.* , 2005**).

L'utilisation d'extraits de plantes et des composés d'origine végétale est des sources précieuses pour la médecine traditionnelle dans le traitement et la prévention d'un large éventail de maladies : notamment des maladies infectieuses (**Al- Bayati, 2007**).

Le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques a conduit les chercheurs à puiser dans le monde végétal et particulièrement les plantes médicinales et culinaires en quête de molécules naturelles efficaces et dénuées de tout effet secondaires. (**Rauter *et al.*, 1989**).

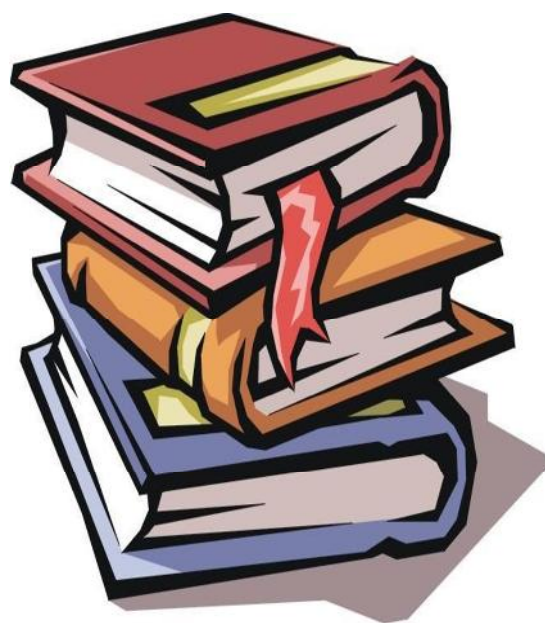
Dans ce contexte s'inscrit le présent travail de recherche dont le but principal est la valorisation de la richesse de l'Algérie en plante médicinale, pour cela notre étude englobe deux aspects dont le premier est l'extraction et dosage des polyphénols ainsi l'aspect phytochimique basé sur une analyse qualitative du contenu en composé phénolique, le second aspect est consacré à une évaluation des activités antimicrobiennes des extraits phénoliques.

Parmi les plantes médicinales les plus utilisées, *Aristolochia longa*, qui est une plante médicinale appartient à la famille des *Aristolochiaceae*, ce genre d'espèce connue sous le nom de « Belrostom » qui est très répandue dans le sud algérien.

Ce travail se repartie comme suit :

- La première partie est consacrée pour la synthèse bibliographique dans laquelle il y'a deux chapitres.
- La deuxième partie présente matériel utilisé suivie des différentes méthodes utilisées pour extraire l'extrait polyphenolique et évaluer l'activité antimicrobienne sur des germes isolés.
- La troisième partie illustre les résultats obtenus et leurs discussions.
- Enfin, ce travail se termine par une conclusion générale et perspectives.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE



I : La plante étudiée et les métabolites secondaire

I.1. *Aristolochia longa*

I.1.1. Description botanique

Aristolochia longa est une plante vivace à tige anguleuse, plus ou moins flexueuse, pouvant atteindre 80 cm ,feuilles ovales, cordées à la base ,à nervures apparentés, longuement pétiolées, disposées alternativement sur presque toute la longueur de la tige ,fleurs verdâtres ou jaunatres,rayées de brun, tubuleuse, en forme de corne au sommet recourbé en tété de cobra, renflées à la base ;fruits capsulaires ;souche longue, cassante(**Baba Aissa,1999**). (Figure n° 01)



Figure n° 01 : *Aristolochia longa* L (Bonnet *et al.*, 2011).

I.1.2. Origine et distribution

Selon le plan d'action et stratégie Nationale sur la Biodiversité,*Aristolochia longa* est considérée en Algérie comme une plante médicinale à usage contrôlé (**Abdelguerfi et Ramdane., 2003**). En Algérie la plante est surtout rencontrée dans la région centre comme Réghaia (**Taleb A, 2003**), à l'ouest au niveau des monts de Tlemcen (**Meslibestaoul *et al.*, 2007**).

I.1.3. Classification botanique

Selon **Maire (1961)** la plante est classée comme suivant :

Règne : Plantae

Phylum : Spermaphyte

Sous phylum : Angiosperme

Classe : Dicotylédone

Sous-classe : Apétale

Ordre : Aristolochiale

Famille : *Aristolochiaceae*

Genre : *Aristolochia*

Espèce : *Aristolochia longa*

I.1.4. Phytochimie d'*Aristolochia longa*

Peu d'études ont exploré la composition chimique d'*Aristolochia longa*, contrairement aux autres plantes du genre.

La plante, comme les autres membres du genre est riche en terpènes. On rapporte également l'identification d'acides aristolochiques. Les acides aristolochiques I (R= OCH₃) et II (R=H) sont des dérivés structurellement apparentés aux acides carboxyliques du nitro phénanthène (figure 02) (**Debelle et al., 2009**).

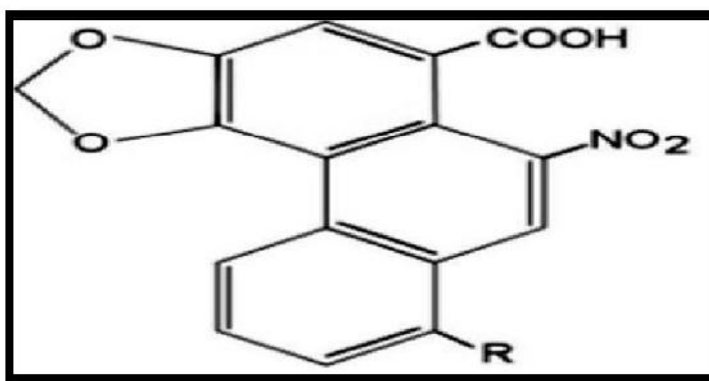


Figure n°02: Structure d'acide aristolochique (**Debelle et al., 2009**).

I.1.5. Usage médicinale

L'*Aristolochia L* est largement utilisée dans médecine populaire algérienne surtout dans le traitement du cancer (**Cherif et al., 2009**) sont utilisation croissante en phytothérapie des cancers au Maroc est également rapportée (**Benzakkour et al., 2011**). Les rhizomes en décoction, son utilisées contre les affections intestinales, les intoxications aiguës et pour

provoquer l'avortement chez la femme (**Lahsissene et al., 2009**). Les rhizomes en poudre mélangé avec du miel est utilisé en cas du cancer. Elle est aussi indiquée en cas de diabète et l'asthme, une décoction est utilisée comme stimulante de l'appétit (**Salhi et al., 2010**).

El hilaly et al., (2003) rapporte son utilisation comme calmant pour les enfants elle est également utilisée dans le traitement des maladies cutanées (**Gonz'alez T et al., 2008**). Pour traiter le leishmaniose cutanée les racines broyées sont appliquées sur l'endroit infecté chaque jour jusqu'à guérison (**El Raffari et al., 2002**).

Cette espèce est utilisé comme antidote pour les morsures de serpents (**Lewis et Elvin-Lewis, 2003 ; Houghton et Osibogun, 1993**), dans les régimes amaigrissants (**Holzbach et Lopes, 2010**) pour prévenir l'arthrite et comme stimulant et emménagogue (**K'Eogh, 1986**). La plante entière est utilisée pour traiter la sclérose, les tumeurs utérines et les cancers du nez (**Gang, 2010**).

I.2. La famille *Aristolochiaceae*

La famille des *Aristolochiaceae* est une famille de plantes herbacées. Durant les vingt dernières années, les membres de cette famille, surtout ceux du genre *Aristolochia*, ont suscité beaucoup d'attention de la part des chercheurs et étaient sujets de plusieurs études pharmacologiques. La famille des *Aristolochiaceae* comprend six genres et environs 625 espèces. Le genre *Aristolochia* est le plus large avec 300 espèces suivi par le genre *Asarum* (**Mulder, 2003**).

I.2.1. Distribution et habitat

Cette famille est rencontrée dans les forêts des régions tropicales et tempérées de l'Amérique, l'Asie, l'Afrique et l'Europe (**Magnoliides, 2006**). Autours des zones de la méditerranée, en dénombre plus de 50 espèces, dont la plupart y sont endémiques (**Wanke, 2006 ; Rulika et al., 2008**).

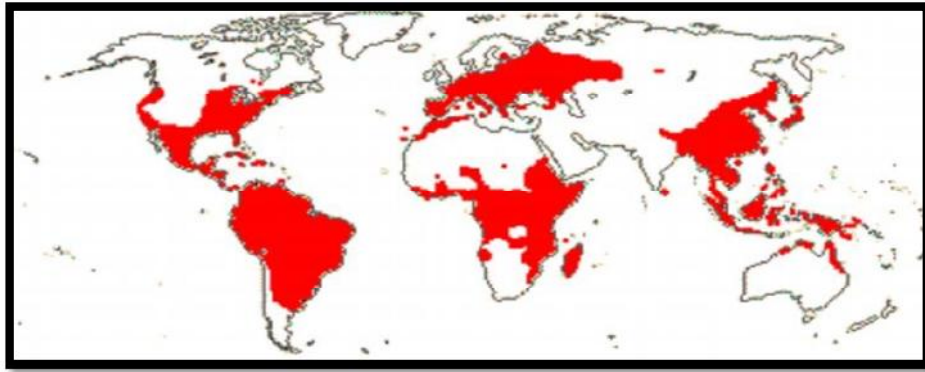


Figure n° 03 : Distribution de la famille des *Aristolochiaceae* dans le monde (Magnoliides, 2006).

I.2.2. Phytochimie du genre *Aristolochia*

Les composés les plus largement rencontrés dans le genre *Aristolochia* sont les terpènes (terpénoides), constituants des huiles essentielles. Les terpènes trouvés dans le genre *Aristolochia* comprennent les mono-sesqui, di-, tri- et tétratérpènes. (Wu *et al.* , 2004) rapportent l'isolement et identification dans le genre *Aristolochia* de 47 monoterpènes, 133 sesquiterpènes, 50 diterpènes, 10 esters sesquiterpènes et diterpènes des acides aristolochiques, 5 triterpènes et un tétraterpène.

I.3. Métabolites secondaires

I.3.1. Définition

Les métabolites secondaires sont des molécules organique synthétisées par les végétaux à partir de métabolites primaires (acides aminés, hydrate de carbone) par diverses voies. (Makhloufi, 2013)

Ces composés sont souvent considérés comme n'étant pas essentiels à la vie de la plante (Levasseur-Garcia *et al.*, 2013), mais plutôt interviennent dans les relations avec les stress biotiques, abiotiques ou améliorent l'efficacité de reproduction ;dont ils participent à la protection de l'attaque des pathogènes ou des herbivores, attraction des pollinisateurs (Guitton, 2010), comme ils participent à des réponses allopathique, ils sont aussi des molécules très utiles pour l'homme comme colorant, arômes, antibiotiques, herbicides, drogue...etc. (Merzougui et Tadj 2015).

I.3.2. Principales classes de métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont caractéristiques des plantes supérieures. Ils sont répartis en trois grandes familles chez les végétaux, sur la base de leurs voies de biosynthèses : les composés phénoliques, les terpenoïdes et les alcaloïdes (**Krief, 2003**).

I.3.2.1. Composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires, d'un poids moléculaire élevé. Ils sont largement répandus chez les plantes et sont très importants dans la contribution à la couleur et au goût des fruits et végétaux (**Manolaraki 2011 ; Riou *et al.*, 2002**).

La structure de base qui les caractérise est la présence d'un ou de plusieurs noyaux aromatiques auxquels sont directement liés un ou plusieurs groupements hydroxyles libres ou engagés dans une autre fonction (éther, ester). Parmi ces métabolites on cite : les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tannins. Ils sont classés selon la présence des différents substituant sur les noyaux et selon leur degré de saturation (**Moussa, 2011**).

I.3.2.1.1. Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont largement distribués dans les fruits, les tiges et les feuilles des légumes (**Andrade *et al.*, 1997**). Ils sont solubles dans les solvants organiques polaires. Les acides phénoliques sont divisés en deux classes : les acides phénoliques dérivés de l'acide benzoïque et les acides phénoliques dérivés de l'acide cinnamique.

➤ Acide phénols dérivés d'acide benzoïque (**Brianceau, 2015**)

- Ce sont des dérivés de l'acide benzoïque.
- Ont une structure générale de base de type (C₆-C₁).
- Existents souvent sous forme d'ester ou de glycosides.

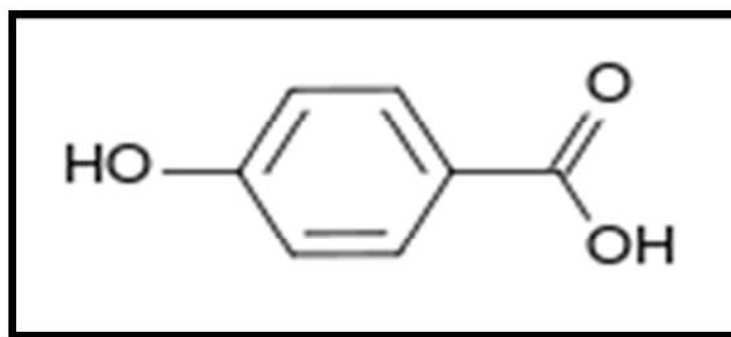


Figure n°04 : Structure chimique de l'acide benzoïque (Crozier *et al.*, 2006**).**

➤ Acide phénols dérivés d'acide cinnamique (Brianceau, 2015)

- Dérivent de l'acide cinnamique.
- ont une structure générale de base de type (C6-C3).
- Existent souvent sous forme combinée avec des molécules organiques.

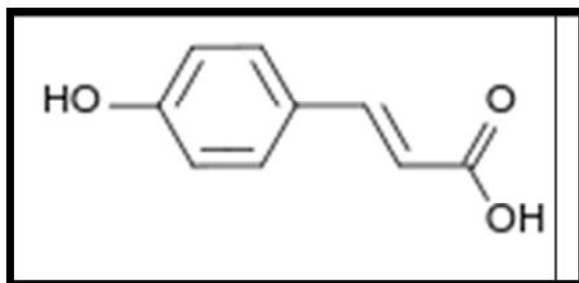


Figure n°05 : Structure chimique de l'acide cinnamique (Crozier *et al.*, 2006).

I.3.2.1.2. Flavonoïdes

Le nom flavonoïdes proviendrait du terme Latin flavus ;(flavus=jaune) (Malesev et Kuntic 2007). Plus de 4000 variétés de flavonoïdes ont été identifiées chez les plantes (Medic-Saric *et al.*, 2004). Ils peuvent être présents dans toutes les parties des plantes : racines, tiges, bois, écorce, feuilles, graines, fleurs et fruits (Rice-Evans *et al.*, 1997), ou ils sont responsable de la couleur de ces derniers (Ferrerres *et al.*, 1993).

La structure de base de ces composées (Figure°04) est le diphényle propane à 15 atomes de carbone (C6-C3-C6) (Bessaoud, 2015), ils sont caractérisés par la présence de deux cycle benzoïques (A et B) et d'un hétérocycle oxygéné (C) (El Kabouss *et al.* , 2011 ; Carvalho *et al.* , 2013).

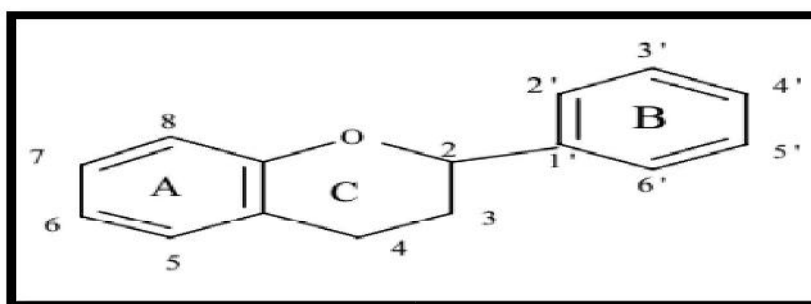


Figure n° 06 : Structure de base des flavonoïdes (Damian-Rayna *et al.*, 2016).

I.3.2.1.3. Tanins

Les tannins sont des substances présentes essentiellement dans les écorces. Ils sont présent sous forme polymérisés, soluble dans l'eau et insoluble dans les solvants organique apolaires (Aguilera-Carvo *et al.* , 2008) et ayant des poids moléculaires compris entre 500-

3000 (Doat, 1978). Ils forment, après coagulation, des composées très stable avec des protéines. Ils ont la propriété de transformer la peau fraîche en un matériau imputrescible, le cuir (**Vandi et al ., 2016**) ; ils possèdent d'autres propriétés telles que l'aptitudes à la précipitation des alcaloïdes, de la gélatine et d'autres protéines (**Dibong et al ., 2015**).

Selon la nature des assemblages moléculaires, les tanins sont subdivisés en deux groupes : les tanins hydrolysable et les tanins condensés (**Barbehenn et al ., 2006**).

➤ Tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysable sont des hétéropolymères dont l'hydrolyse chimique libéré un sucre, généralement le glucose, et un acide phénolique. L'acide libéré peut être l'acide gallique dans le cas des tanins galliques, l'acide hexahydroxydiphénique et dérivés comme l'acide éllagique dans le cas des tanins éllagique (**Mole et al ., 1993**).

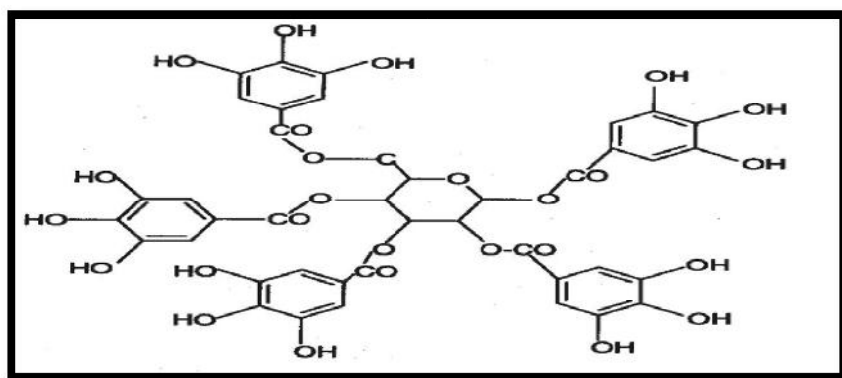


Figure n°07 : Structure chimique d'un tanin hydrolysable (**Magalhães et al., 2014**).

➤ Tanins condensés (pronthocyanidines)

Les tanins condensés sont des polymères de certains flavonoïdes, constitués d'unités de flan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone, le plus souvent entre C4 et C8 ou C4 et C6. Ce sont en général des polymères de Catéchine ou catéchols, ils ne s'hydrolysent pas sous l'action des minéraux dilués (**Mehansho et al ., 1987**) ;(**De Freitas et al ., 2003**). Ils jouent un rôle dans la protection contre les rayons ultras violet, la sécheresse et contre les prédateurs naturels (insectes et herbivores) (**Aufrere et al ., 2012**).

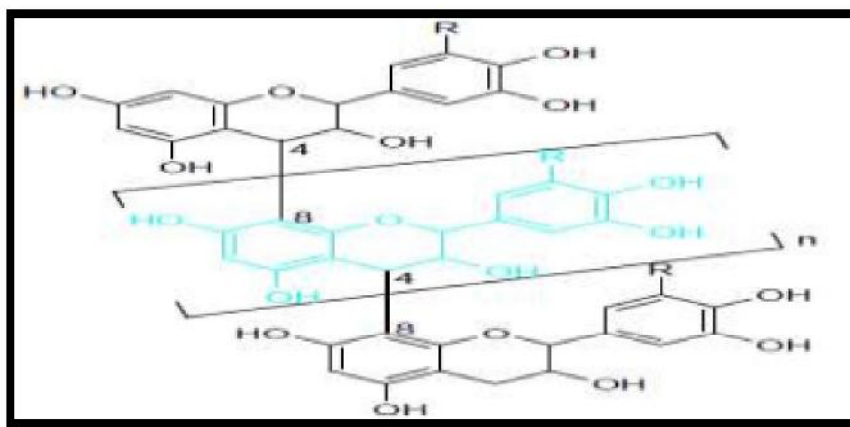


Figure n°08 : Structure chimique d'un tanin condensé (Royer *et al.*, 2012).

I.3.2.2. Terpènes (terpénoides)

Ils constituent un vaste groupe de métabolites secondaires, ce sont des hydrocarbures naturels, de structure cyclique ou de chaîne ouverte (Merzougui et Tadj 2015). Ils répondent dans la plupart de cas à la formule générale (C_5H_8) c'est-à-dire leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'unités isopréniques à 5 atomes de carbone (Hernandez Ochoa, 2005). Ils constituent une importante classe de produits secondaires, hydrophobes quelquefois volatils. (Seaman *et al.*, 1982).

Selon le nombre d'unités isopréniques qui les constituent, on distingue : les terpènes ou monoterpènes en C_{10} , les sesquiterpènes en C_{15} , les diterpènes en C_{20} , les triterpènes en C_{30} , et les tétraterpènes en C_{40} (Mezouar, 2013).

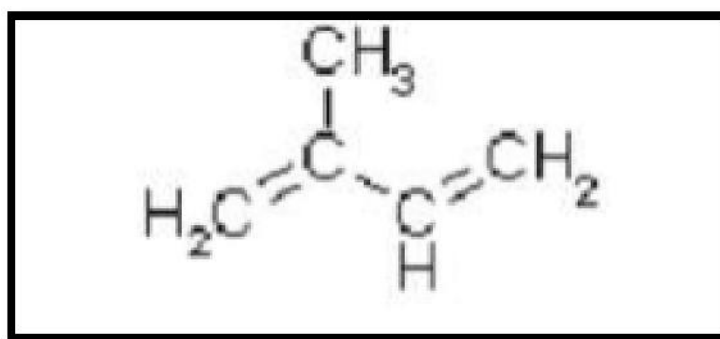


Figure n°09: Structure de la molécule d'isoprène (Mostafa, 2008).

I.3.2.3. Alcaloïdes

Le terme alcaloïdes a été introduit par W. Meisner au début du 19^{ème} siècle pour désigner des substances naturelles réagissant comme des bases. Ce terme est dérivé de

l'arabe « Al Kaly » qui signifie la soude et de grec « Eidos » qui signifie l'aspect (**Mangambu *et al.* , 2014**).

Les alcaloïdes sont des substances organiques le plus souvent d'origine végétale, azotées, basiques et douées à faible dose de propriétés physiologiques marquées (**Belabbassi, 2012**), ce sont des corps de masse moléculaire faible et de fonction basique. Cette dernière est un facteur d'instabilité pour ces molécules qui à l'état de base et en solution, sont sensible à la chaleur, à la lumière et à l'oxygène (**Dao *et al.* , 2016**).

Ils portent tous la terminaison « ine » (**Paris et Hurabielle 1981**). A l'état normal, ils sont généralement salifiés par les acides organiques (tartrates, malates ...) ou combinés à des tanins (**Merzougui et Tadj 2015**). Selon l'origine biosynthétique on distingue trois types d'alcaloïdes :

- Les alcaloïdes vrais : l'azote inclus dans un hétérocycle, ce groupe représente la majorité des alcaloïdes.
- Les proto-alcaloïdes : ils ne possèdent pas un azote intra-cyclique, ils ont une structure proche des amines (**Ghedjati, 2015**).
- Les pseudo-alcaloïdes : ils présentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ne sont pas des dérivés des acides aminés (**Pinheiro, 2015**).

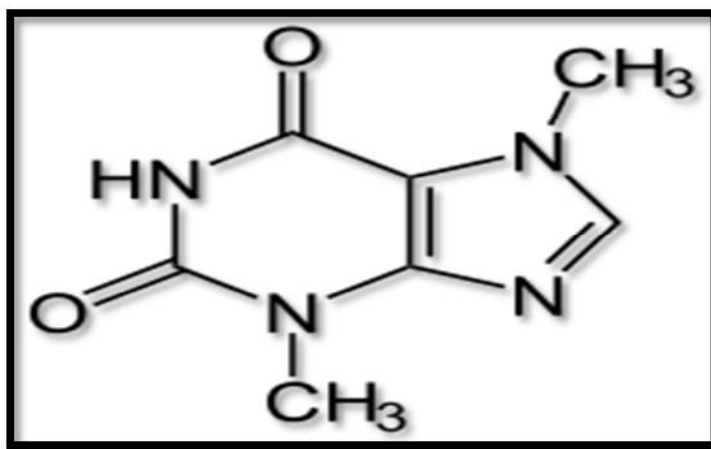


Figure n°10 : Structure des alcaloïdes.

I.3.3. Biosynthèse des polyphénols

Les polyphénols sont synthétisés par deux voies biosynthétiques :

- Celle de l'acide shikimique, qui conduit après transamination et désamination, aux acides cinnamiques et à leurs nombreux dérivés tels que les acides benzoïques ou les phénols simples.

- Celle issue de l'acétate-malonate, qui conduit à des poly B-coesters (polyacétates) de longueur variable menant par cyclisation à des composés polycycliques tels que les dihydroxy-1,8 anthraquinones ou les naphthoquinones. (**Mahmoudi *et al.* , 2013**).

De plus la diversité structurale des composées poly phénoliques due à cette double origine biosynthétique, est encore accrue par la possibilité d'une participation simultanée des deux voies dans l'élaboration de composés d'origine mixte, les flavonoïdes. (**Bernatova *et al.*, 2010**).

I.3.4. Propriétés des composés phénoliques

1.3.4.1. Propriétés physico-chimiques

Les polyphénols sont généralement des composés aromatiques solubles dans les solvants polaires tels que l'éthanol, le méthanol, le butanol, l'acétone, le diméthylsulfoxyde, l'eau, ...etc. (**Benkrief, 1990**).

Les polyphénols moins polaires comme les isoflavones, les flavonones, les flavones et les flavonols sont plus solubles dans d'autres solvants tels que l'éther et le chloroforme (**Verykokidou- Vitsaropoulou et Vajias, 1986**).

1.3.4.2. Propriétés biologiques

Chez les plantes, les composés phénoliques sont impliqués dans différents processus comme la germination des graines et la croissance des plantes (**Marcheix *et al.* , 2005**).

Ces dernières années les recherches sur les composés phénoliques se sont accentuées en raison de leurs activités anti-inflammatoires, antibactériennes, antifongiques et anti-oxydantes.

I.4. Activité antimicrobienne

Dès l'antiquité, plusieurs plantes ont été utilisées traditionnellement pour le traitement des diverses maladies. De nos jours, il y a un grand progrès dans l'utilisation de ces plantes pour la fabrication d'antibiotiques et de médicament pour le traitement de plusieurs infections dues aux divers pathogènes. Dans le but de recherche *in vitro* l'activité antimicrobienne des composés naturels à partir d'extraits de plantes sur des agents pathogènes, la méthode de diffusion solide des disques est la plus utilisée pour estimer ces activités. Cette technique consiste à incuber différents souches de bactéries en ajoutant des extraits de plantes est déterminé par l'apparition des plages de lyses qui résultent de la multiplication de ces

bactéries. L'activité antimicrobienne est liée à la présence des groupements hydroxyles dans leur structure (**Cowan, 1999**).

Une contamination des végétaux par des microorganismes pathogènes entraîne une forte augmentation des teneurs en composés phénoliques, ce qui correspond à la mise en place de mécanismes de défense de la plante (**Macheix et al., 2005**).

II. Lait de vache cru et contaminants

II.1. Le lait de vache cru

En Algérie, le lait de vache revêt un caractère hautement stratégique puisqu'il occupe une place importante dans le modèle de consommation algérien (**Mansour, 2015**). En effet, il constitue un aliment de haute qualité nutritive très riche et équilibré, parfaitement adapté aux besoins nutritionnels et physiologiques de tous les âges de la vie. Autrement dit, le lait de vache est à la fois un aliment traditionnel et une boisson d'un grand intérêt nutritionnel, car il représente un aliment de base presque complet et se prête à de nombreuses applications culinaires, industrielles et technologiques (**Ghazi et Niar, 2011**). Le lait constitue une source énergétique importante, c'est un fluide très variable et tellement complet (**Sissao et al., 2015**).

II.2. Les dangers de la contamination du lait

La flore de la contamination se définit comme l'ensemble des microorganismes contaminant le lait, de la récolte jusqu'à la consommation (**Vignola, 2002**). Cette contamination provoque une incidence sur la santé du consommateur et sur l'industrie laitière.

✓ Chez le consommateur (Homme), elle cause des dangers tels que :

- Intoxication alimentaire
- Trouble de tube digestif dus à l'ingestion de la bactérie
- Enterotoxine dont l'ingestion provoque une toxoinfection alimentaire qui se manifeste par des nausées, vomissements, diarrhées, douleurs abdominales et maux de tête.
- Provoque des infections (abcès cutanés, mammites).

✓ Sur l'industrie laitière :

La contamination du lait s'impacte directement sur la production laitière, qui est causée par le manque d'hygiène ce qui cause l'arrêt et la paralysie de la production et de la suspension de la vente, et aussi création des problèmes de pénurie pour les consommateurs et les distributeurs.

II.3. Description des microorganismes étudiés

- ***Bacillus sp* :**

Bacillus cereus est une bactérie sporulée, aéro-anaérobie facultative et thermorésistante. Ces caractéristiques lui confèrent une résistance particulière à l'action des bactéricides, aux désinfectant, aux radiations et au cycle froid (Cadel six *et al.*, 2010).

- ***Staphylococcus sp* :**

Ce sont des Cocci à Gram positif très fréquent chez l'homme à l'état commensal ou pathogènes sont immobile, non sporulé et ne possédant pas de capsule visible au microscope optique. Ils se présentent de façon isolée, en diplocoques ou groupés en amas (Ferrone, 1983 ; Flandrois, 1997).

Tableau n° 01 : Classification des souches bactériennes étudiées

Classification	<i>Staphylococcus sp</i>	<i>Bacillus sp</i>
Règne	Bacteria	Bacteria
Phylum	Firamicutes	Firamicutes
Classe	Bacilli	Bacilli
Ordre	Bacillales	Bacillales
Famille	<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Bacillaceae</i>
Genre	<i>Staphylococcus</i>	<i>Bacillus</i>
Espèce	<i>Staphylococcus sp</i>	<i>Bacillus sp</i>

MATERIEL ET METHODES



I. Matériel

I.1. Matériel biologique

I.1.1. Récolte

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de microbiologie, faculté des Sciences Biologique et des Sciences Agronomiques. Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

L'espèce végétale étudiée est *Aistolochia longa*, les différents essais sont effectués sur les feuilles qui sont récoltées dans la région de Tizi- Rached, au mois de Mars 2019 avec une durée de stage de 6mois.

L'utilisation de la plante a été précédée par les étapes suivantes :

- Le séchage : la partie aérienne de la plante est séchée à l'air libre, à l'abri de la lumière et à température ambiante, afin de pouvoir conserver le maximum de métabolites secondaires de la plante.
- Le broyage : une fois séchée, les feuilles sont ensuite broyées à l'aide d'un broyeur électrique.
- Le tamisage : le broyat obtenu est tamisé dans une passoire, le produit résultant est une poudre fine prête à l'utilisation.
- Conservation : cette poudre est conservée dans un flacon en verre, et stockée à l'abri de l'air, de l'humidité et de la lumière jusqu'à utilisation.

I.1.2. Matériel non biologique (voire l'annexe)

I.1.3. Milieux de culture

Les milieux de culture utilisés dans ce travail sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau n° 02 : Milieux de culture utilisés.

Gélose nutritive	Repiquage des souches bactériennes.
Gélose Muller Hinton	Réalisation de l'antibiogramme standard.
Mossel	Identification de <i>Bacillus cereus</i> .
Gélose ADN	Recherche de la désoxyribo-nucléase des bactéries.
Chapman	Permet la croissance des espèces du genre <i>Staphylococcus</i> .
Mannitol-mobilité	Permet la mise en évidence (ou non) de la mobilité bactérienne.

I.1.4. Produits chimiques

Le tableau suivant représente les produits chimiques utilisés :

Tableau n° 03 : Différents produits chimiques et leurs utilisations.

Solvants	Méthanol et l'acide formique.	Extraction des polyphénols.
Réactifs	Folin-Ciocalteu.	Dosage des polyphénols
	Carbonate de sodium (Na_2CO_3).	
	Chlorure ferrique (FeCl_3).	Identification des Tanins
	Alcool isoamylique ($\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}$).	Identification des Flavonoïdes

2. Méthodes

2.1. Echantillonnage

Des prélèvements de lait cru ont été effectués durant la période qui s'étend de la fin de mois de Septembre jusqu'au mois d'octobre 2019 dans trois régions différentes OUADHIAS, TIGZIRT et FREHA. Le nombre a porté sur 12 échantillons, conditionnés dans des flacons stériles et directement placés dans une glacière contenant des blocs réfrigérants congelés. Ces échantillons ont été acheminés vers le laboratoire pédagogique de microbiologie, et immédiatement analysés, pour que l'échantillon soit représentatif, non endommagé ou modifié lors du transport (**Hamiroune et al., 2014**).

Le prélèvement s'effectue par usage des méthodes traditionnelles, dans des flacons stériles, on éliminant les premiers jets, le flacon est rempli au 2/3 de sa capacité, et pour éviter le développement bactérien, l'échantillon est conservé dans une glacière et transportés jusqu'au lieu d'analyse (**Guiraud, 2003**).

2.2. Extraction des polyphénols

L'extraction et le dosage des composés phénoliques sont réalisés sur la poudre obtenue des feuilles de *Aristolochia longa* préparée.

Cette étape consiste à extraire le maximum de substance active contenue dans la plante par macération en utilisant dans ce cas le méthanol comme solvant organique principale.

Cette méthode d'extraction a été effectuée selon le protocole décrit par **Revilla et al., (2001)**, avec quelques modifications (qui concerne la quantité de la poudre et du solvant) :

- Une quantité de 30g de poudre fine de *A. longa* a été ajouté à 100 ml du mélange méthanol-acide formique (95-5) ;
- Laisser macérer pendant 72h, ensuite filtrer avec le tissu mousseline ;

- Filtrer une seconde fois avec un papier filtre ;
- Le filtrant est par la suite concentré pour obtenir une solution aqueuse chargé en substance bioactives ;
- L'extrait est conservé à 4°C jusqu'à utilisation.

La figure ci-après représente le schéma qui résume le protocole et les étapes suivies pour l'extraction des polyphénols :

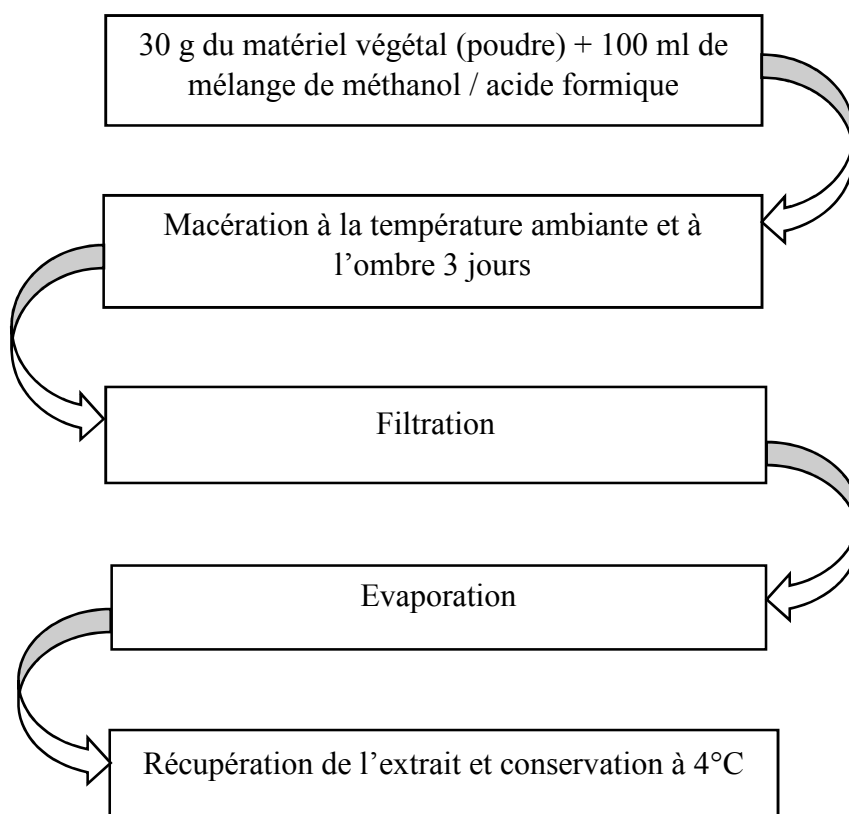


Figure n°11 : Schéma récapitulatif de la procédure d'extraction des polyphénols

Rendement :

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*).

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

Où :

R : le rendement en (%) ;

M_{ext} : la masse de l'extrait après évaporation du solvant en (g) ;

$M_{\text{éch}}$: la masse sèche de l'échantillon végétal en (g).

a. Dilution de l'échantillon

L'extrait est dilué à chaque fois au demi ($1/2$), on obtient $1/2$, $1/4$, $1/8$, $1/16$, $1/32$, $1/64$. La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établis avec l'acide gallique (AG). Elle est exprimée en mg équivalent d'acide gallique par gramme de la matière sèche (mg EAG/g de matière sèche).

2.3. Analyse phytochimique

Les tests phytochimiques ont été réalisés sur l'extrait de la plante par des techniques de caractérisation qualitatives, selon les méthodes de (Evans., 2009 ; Harborne., 1998 ; Wadood *et al.*, 2013), dans le but de détecter quelques familles de composés co-existants. Ils consistent en une réaction de précipitation une coloration par des réactifs spécifiques.

2.3.1. Flavonoïdes

Ajouter dans un tube à essai 2 ml d'extrait à tester mélangé avec 5ml d'acide chlorhydrique (HCl) dilué 2 fois. En ajoutant 2 à 3 copeaux de magnésium, il y'a un dégagement de chaleur puis une rose-orangé ou violacée. L'addition de 3 gouttes d'alcool isoamylique ($C_5H_{12}O$).

2.3.2. Tanins

Dans un tube à essai, introduire 2ml d'extrait à analyser et ajouter 1ml d'une solution aqueuse de Chlorure ferrique ($FeCl_3$). L'apparition d'une coloration bleu-noirâtre ou verte plus ou moins foncé fut le signe de la présence de Tanins dans l'extrait

2.4. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux dans les différents extraits a été réalisé par la méthode de Folin-Ciocalteu décrite par (Hogan *et al.*, 2009 ; Segade *et al.*, 2008 ; Waterhouse, 2001).

• Principe

Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et phosphomolibdique ($H_3PM_{12}O_{40}$), il est réduit par les phénols en un mélange d'oxydes bleu de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}), (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1982). Cette coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle aux toux de composés phénoliques présents dans le milieu donne un maximum d'absorption à 765nm,

(Georgé *et al.*, 2005). Une courbe d'étalonnage a été réalisée en utilisant l'acide gallique comme standard afin de déterminer les concentrations en phénols totaux des extraits exprimés en mg équivalent acide gallique /g d'extrait.

- **Mode opératoire**

- 10 µl d'extrait de l'échantillon ;
- 1,58 ml d'eau distillée ;
- 100 µl de réactif de Folin-ciocalteu ;
- Le mélange obtenu est laissé 5min à température ambiante à l'obscurité ;
- Ajouter 300 µl d'une solution de bicarbonate de sodium ;
- Incuber pendant 2h à une température ambiante à l'obscurité ;
- Lire l'absorbance à 765 nm.

- **Courbe d'étalonnage**

A partir d'une solution mère de l'acide gallique de 1mg/ml, une série de solutions filles est ainsi préparée, de concentrations allant de 0,1 à 1 mg/ml. Cette courbe a été réalisée suivant la même procédure utilisée pour le dosage des polyphénols.

2.5. Recherche, Isolement et purification des micro-organismes

Un écouvillon stérile est trempé dans l'échantillon du lait afin de racler pour assurer une récupération maximale de germe .L'écouvillon chargé est mis dans un tube stérile contenant 5ml de Tryptone-sel-eau (TSE), l'opération est répétée deux fois mais dans un autre tube, qui vont être agités pendant au moins cinq seconde pour détacher les germes. Un traitement thermique de 80°C pendant 10 min est appliqué pour l'un des échantillons préparé ensuite, un autre écouvillon trempé dans le tube qui contient de TSE et les germes afin de réaliser les ensemencements à la surface du milieu contenant de la gélose nutritive, l'incubation dure de 24h à 48h à 37°C (Peng,2001).

Après incubation de chaque boîte ensemencée, on choisit toutes les colonies qu'ont des aspects différents pour l'isolement. Chaque colonie choisie est ensemencée sur milieu gélose nutritive. L'incubation est effectuée à 37°C pendant 24h .Cette opération est renouvelée jusqu'à l'obtention de colonies pure.

2.6. Identification phénotypique des souches

2.6.1. Caractérisation morphologique des isolats

2.6.1.1 Aspect macroscopique des colonies

L'aspect macroscopique des colonies (Aspect, couleur) est déterminé après incubation à 37°C sur GN (Gélose Nutritive) pendant 24h à 48h. Cette observation permet d'effectuer une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification. D'après les auteurs Thoma *et al.*, (1970), les éléments d'identification macroscopique sont :

- ✓ **La taille** : est mesurée à l'aide d'une règle graduée pour les grandes colonies. Il est possible aussi d'utiliser le microscope au grossissement le plus faible : en comparant la taille de la colonie et le diamètre du champ, on aura une idée plus précise de la taille des petites colonies ;
- ✓ **La forme** : (bombée, ronde, plate, ombiliquée, à centre surélevé, à bords dentelés, en étoile.) ;
- ✓ **L'aspect de la surface** : est bien observé par transillumination oblique. Il peut être lisse, rugueux, ...etc.
- ✓ **L'opacité** : les colonies sont décrites comme : opaques (ne laissent pas passer la lumière), translucides, transparentes ;
- ✓ **La consistance** : Il s'agit d'apprécier si les colonies sont grasses, crémeuses, sèches ou encore muqueuses ;
- ✓ **La couleur (pigmentation)** : les colonies sont habituellement de couleur crème. Une couleur différente est due à des pigments.

2.6.1.2. Aspect microscopique

La morphologie, l'arrangement des cellules le type pariétale des isolats sont déterminés sur des cultures jeunes par la technique de coloration de Gram (1884) à l'aide d'un microscope optique (**ZEISS-weastGermany**).

✓ Coloration de Gram

Cette technique s'applique comme suit :

- Réalisation d'un frottis, et fixation de ce dernier par la chaleur.
- Coloration au violet de Gentiane en planant la lame dans la solution pendant une minute, ensuite, le rincer avec de l'eau distillée.

- Mordançage au Lugol en étalant le Lugol sur la lame et laissé agir une minute, puis rincer avec de l'eau distillée.
- Décoloration à l'alcool par le versement de quelques gouttes sur la lame, laissé agir pendant 30 secondes et le rincer encore une fois avec de l'eau distillée.
- Contre coloration avec la Fushine pendant une minute, puis le rincer délicatement avec de l'eau distillée.
- Séchage de la lame et observation au microscope photonique au grossissement 100 en ajoutant quelques gouttes d'huile à immersion.

2.6.1.3. Caractères biochimique :

Les épreuves biochimiques permettent en général de distinguer les espèces, même étroitement Apparentées entre elles (Marchal *et al.*, 1982).

2.6.1.3.1. *Staphylococcus sp*

- **Test de catalase**

La présence de la catalase est mise en évidence en déposant à l'aide d'une anse une quantité suffisante de la colonie sur une lame en verre contenant une goutte d'eau oxygénée. La présence de l'enzyme se traduit, en quelques secondes, par l'apparition de bulles d'air et dégagement gazeux (Gerhardt *et al.*, 1994).

- **Test de désoxyribonucléase (ADN ase)**

Le test est utilisé pour déterminer la capacité d'un organisme à hydrolyser l'ADN, grâce à une enzyme, l'ADN ase. Cette enzyme est recherchée par la culture des souches à tester sur des boîtes de Pétri contenant de la gélose à ADN. L'incubation est réalisée à 37°C pendant 24h. La mise en évidence de cette enzyme se traduit par la présence d'une zone claire tout autour de la culture bactérienne, après inondation de la boîte Pétri avec une solution de bleu de toluidine (Enari *et al.*, 1998).

- **Test de coagulase**

L'identification de *Staphylococcus aureus* se base sur la morphologie coloniale, les caractéristiques biochimiques et l'examen microscopique. Toutefois, la détection de la coagulase est le critère le plus généralisé pour différencier une espèce d'une autre.

L'essai est réaliser par le mélange de 0.5 ml d'une culture de *Staphylococcus aureus* sur bouillon cœur cerveau (BHIB) à un tube stérile contenant le plasma, l'incubation se fait à 37°C pendant une durée maximale de 4 heures. La formation d'un caillot indique la production de coagulase (Dagnra *et al.*, 2000).

- **Test de mannitol**

Ce test se fait sur milieu Chapman, qui est un milieu sélectif pour les Staphylocoques.

2.6.1.3.2. *Bacillus cereus*

-Forme de la spore : de forme déformante ovale ce qui modifie la forme du bacille en un bacille ovale.

-Ensemencement sur milieu Mossel : Le milieu Mossel est un milieu sélectif utilisé pour la recherche et le dénombrement de *B.cereus*. Son principe repose sur l'incapacité de *B.cereus* à fermenter le mannitol (colonies roses). Le milieu est rendu inhibiteur vis-à-vis des autres bactéries par le sulfate de la polymyxine B (Messelhauser *et al.*, 2010).

2.7. Etude de l'activité antimicrobienne

- **Principe**

Le principe de l'activité antimicrobienne des extraits polyphénoliques consiste à réaliser une culture microbienne sur milieu MH, en présence de disque imbibé de polyphénols. Si les polyphénols ont une activité antimicrobienne, on observera une zone d'inhibition autour du disque due à la diffusion des échantillons. Ce principe est illustré par la figure :

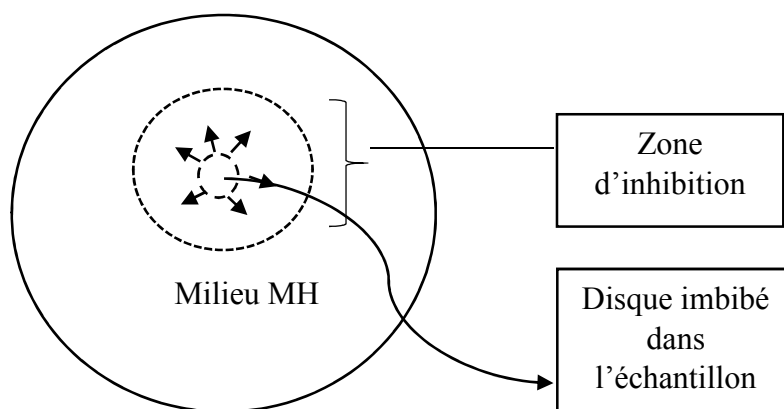


Figure n°12 : Schéma du test antimicrobien.

Comme le montre la figure, nous devons observer la présence d'une zone claire qui est la zone d'inhibition où la molécule active agit de façon efficace.

Conventionnellement, le diamètre d'inhibition qui reflète l'efficacité de l'activité antimicrobienne englobe la zone d'inhibition et le disque.

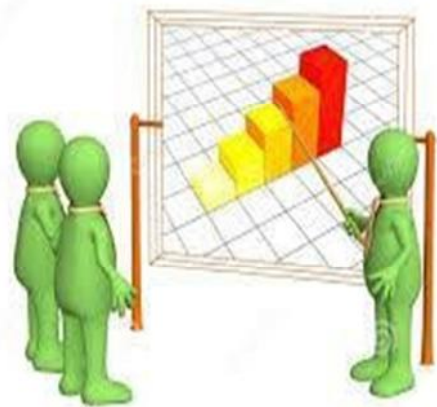
- **Mode opératoire**

Liquéfier le milieu Muller Hinton, et le mettre dans des boîtes de Pétri. Ensuite, réaliser une pré-culture de chaque souche dans un tube contenant 5ml de l'eau physiologique,

mettre dans ce tube une colonie microbienne, la suspension est bien agitée. Une fois la suspension est préparée on mesure l'absorbance au spectromètre avec une longueur d'onde de 620nm qui est équivalente à une charge bactérienne de 10^8 UFC. Après, tremper un écouvillon sec stérile dans l'inoculum et éliminer l'excès d'inoculum en pressant l'écouvillon en le faisant roulet contre les parois du tube au-dessus du niveau de liquide. Ensuite, ensemer en stries sur toute la surface des boites à trois reprises et passer enfin l'écouvillon sur le bord de milieu MH et laisser sécher la boite pendant quelques minutes avant de déposer les disques contenant 10µl de l'extrait polyphénolique sur le milieu MH.

A la fin incuber pendant 24 h à 37°C (CLSI, 2010).

RESULTATS ET DISCUSSIONS



III. Résultats et discussion

1. Caractéristiques de l'extrait

L'extrait obtenu est d'aspect gélatineux, non miscible avec l'eau, d'une odeur aromatique et couleur brune verdâtre due à la présence de la chlorophylle, de métabolites secondaires...etc. Ce même résultat est obtenu par Dali (2017), pour une plante différente.



Figure n°13 : Aspect de l'extrait obtenu.

2. Taux d'extraction

Dans ce travail, une macération a été réalisée sur la poudre de la partie aérienne (feuilles) d'*Aristolochia longa* en utilisant le solvant : méthanol et acide formique. Le rendement a été déterminé par rapport à 30g de matière végétale. Le rendement d'extraction est le rapport entre la quantité de substance naturelle, extraite par l'action extractive d'un solvant et la quantité de ces substances contenues dans la matière végétale.

Il dépend de plusieurs facteurs tels que : le solvant, le pH, la composition de l'échantillon, le temps d'extraction et l'environnement de la plante (climat et sol). (Angkawijaya *et al.*, 2014).

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau n° 04 : Poids de l'extrait et le rendement d'extraction des composés phénoliques de la plante *A.longa*.

Méthode d'extraction	Poids d'extrait (g)	Rendement (%)
Macération (méthanol-acide formique, 95 : 5).	3,78	12,6

L'extraction des polyphénols des plantes médicinales est l'une des principales étapes de nombreuses études biologiques. Le rendement de cette extraction peut être affecté significativement par plusieurs paramètres, dus à la différence d'espèce, à la partie de la plante utilisée, sa taille ainsi que sa composition et les conditions de sa conservation. Le pH, la présence de substance interférentes sont aussi des paramètres importants pour que une meilleurs extraction. (Nawaz *et al.*, 2006 ; Vuong *et al.*, 2013).

Un rendement de 12,6% est considéré important, ceci serait dû à la méthode, la température et de la taille des particules constituant la poudre de la plante, et à la nature du solvant d'extraction utilisé, le méthanol est connu comme étant un solvant adéquat à l'extraction des polyphénols, ces derniers sont solubles dans ce solvant (Jaradat *et al.*, 2015).

3. Dosage des polyphénols totaux

Au cours de dosage des polyphénols, après l'addition du réactif de Folin-Ciocalteu, une couleur bleue est apparue, ce qui confirme la présence des polyphénols dans l'extrait d'*Aristolochia longa*

L'analyse quantitative des phénols totaux, a été déterminée à partir de l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage ($y = 0,6096x - 0,0077$; $R^2 = 0,9939$), en utilisant l'acide gallique comme standard. (Wong *et al.*, 2007).

Depuis la courbe de croissance, la concentration en polyphénols dans l'extrait obtenu est de 1,0422 mg EAG/g qu'est une teneur faible.

Selon Benarba et Boumedienne, les résultats du criblage phytochimique ont révélé que l'extrait aqueux d'*A. longa* récoltée dans la région ouest de l'Algérie : Mascara, contenait divers composés bioactifs, notamment des polyphénols et des flavonoïdes. Teneur phénolique totale dans l'extrait aqueux d'*A. longa* est de $6,07 \pm 0,12$ mg EAG/g, ce taux est inférieur à celui obtenu dans le présent travail, ceci serait dû à l'environnement de la collecte de la plante, qui pousse la plante à synthétiser moins de métabolites secondaires.

4. Analyse phytochimiques des substances polyphénoliques

Les résultats des tests colorimétriques ont montrés que :

D'après la coloration noire et rose-orangé obtenue avec FeCl_3 et $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}$, la partie aérienne d'*Aristolochia longa* contient des tanins et des flavonoïdes respectivement.

L'analyse phytochimique de l'extrait aqueux d'*Aristolochia longa* montre qu'elle est riche en principes actifs tel que les tanins et les flavonoïdes.

La présence de ces principes actifs suggère la capacité de notre plante à jouer un rôle majeur en tant qu'agent antimicrobien (Tepe *et al.*, 2006).

Ces résultats sont cohérents avec plusieurs études; ils déclarent que le criblage phytochimique d'extrait aqueux d'*Aristolochia longa* a révélé la présence de polyphénols, de flavonoïdes (Benarba *et al.*, 2016). D'autres études ont publié que le criblage phytochimique des *Aristolochia bracteata* révèle la présence, de flavonoïdes, tanins et autres composés (Bhaaskaran *et al.*, 2014).

5. Isolement des souches

Des colonies de différents aspects macroscopiques sont apparues après incubation 24h à 48h sur la gélose nutritive (GN).

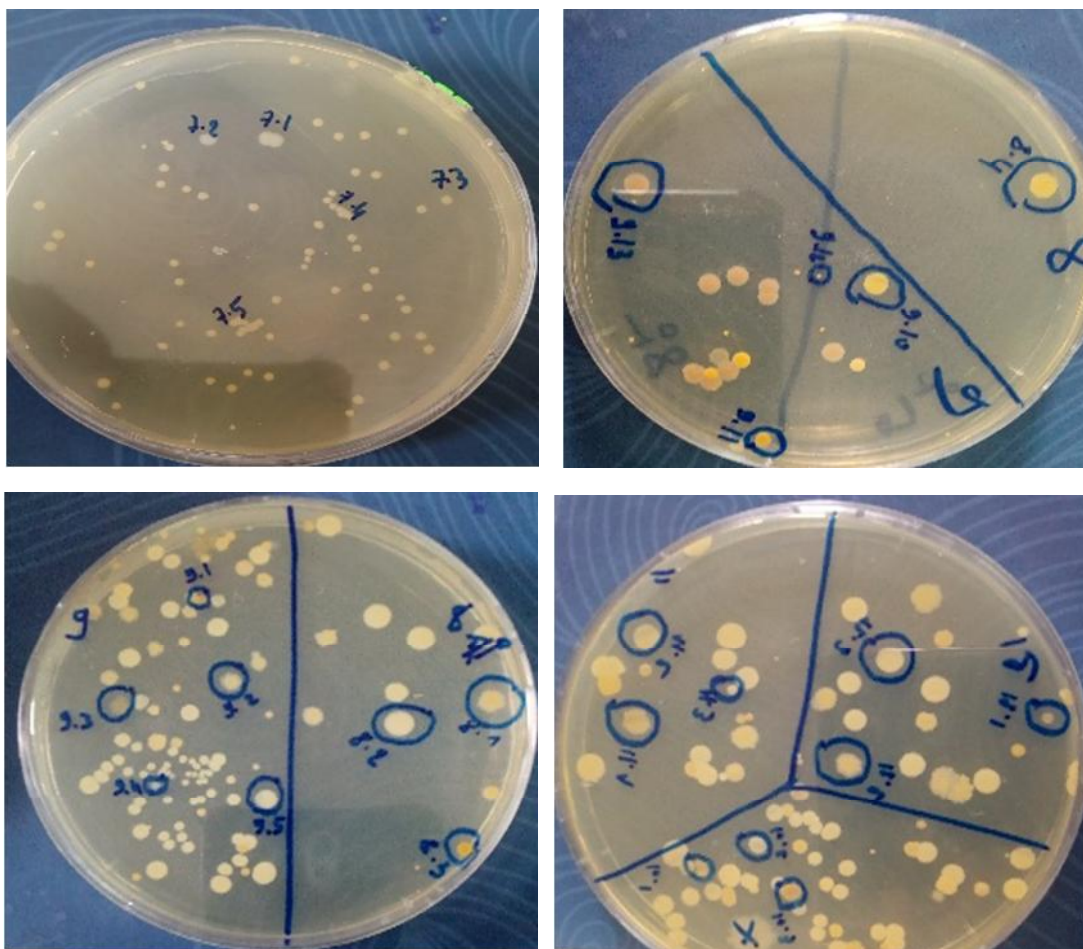


Figure n°14 : Exemples d'aspects macroscopiques des isolats cultivés sur GN

6. Purification des souches

Après purification des colonies par ensemencement par séries de stries, 60 souches ont été sélectionnées à partir de milieu gélose nutritive, la sélection selon des critères fixés.

Bactéries	Caractères morphologiques	Caractères Cultureux	Caractères biochimiques
<i>Staphylococcus sp</i>	Cocci à Gram positif en courtes chainettes, ou en grappe de raisin, immobile, non sporulé et non capsulé (Avril G.L, 1992 ; Berche P, 2003).	Aéro-anaérobie facultatif, cette bactérie produit un pigment jaune orangé. Les colonies sont rondes, lisses, bombées, brillantes et opaques (Avril J.L et Monteil H, 2000).	Catalase+, oxydase-, fermente le glucose, mannitol+, indole-, uréase+ et producteur d'enzyme staphylocoagulase. (Monnier M et Denis F, 20007).
<i>Bacillus sp</i>	Bacille à Gram positif en paires ou en chainettes courtes, sporulé, mobile (Murray P.R et al., 2007).	Aéro-anaérobie facultatif. Les colonies sont de couleurs blanches d'aspect granuleux (Ray C.G et al., 2004).	Catalase+, oxydase variable (Danielle Clave, 2014).

Tableau n° 05 : Caractéristiques des principaux germes étudiés.

7. Caractérisations phénotypiques des isolats

7.1. Examen macroscopique des isolats :

L'observation des caractères cultureux des colonies est le premier examen qui a été effectué après l'incubation des souches à 37°C sur gélose nutritive. Les résultats obtenus sont illustrés dans le **tableau 06**. Après incubation, les souches formant des colonies ronde, envahissante de moyenne et de petite taille, de surfaces lisses et de couleur blanches dans les plupart des cas.

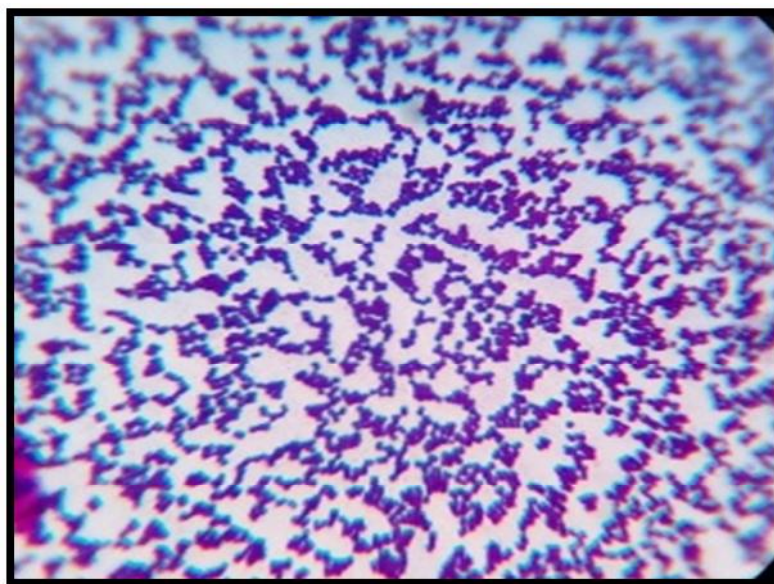
Tableau n°06 : Caractères cultureux des souches.

Souches	Forme	Taille	Couleur	Surface
1.1-2.2-6.1-6.3-10.5	Irrégulière	Grande	Blanche	Lisse
1.4-1.2-7.4-7.5	Irrégulière	Petite	Blanche	Lisse
1.3-3.4-6.2-7.1-10.2-11.3-12.3	Ronde	Moyenne	Blanche	Lisse
5.4-11.2-12.6	Ronde	Moyenne	Blanche	Rigoureuse
2.1- 4.2-5.1-6.6-	Ronde	Petite	Blanche	Lisse

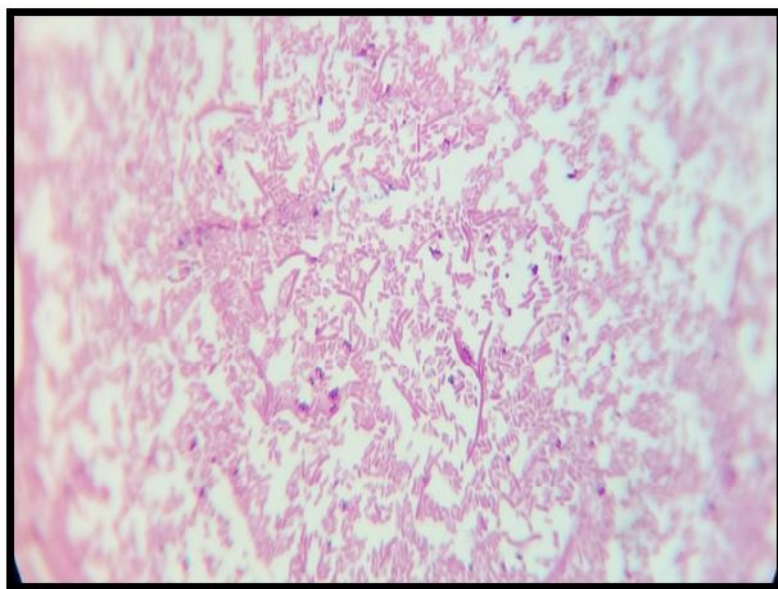
7.2-9.3-9.4-9.8-10.1				
8.4-9.1	Ronde	Moyenne	Jaune	Lisse
9.9-11.4	Ronde	Moyenne	Orange	Lisse
2.3-3.1-3.3-7.3-6.7-10.4-12.1-6.5	Envahissante	Petite	Blanche	Lisse
5.5-9.7-8.3-12.4-12.5-10.3-9.6	Envahissante	Petite	Jaune	Lisse
3.2-4.1-4.3-5.6-5.3-9.5-8.2-6.4	Envahissante	Moyenne	Blanche	Lisse
5.2-9.2-8.1-11.1-12.2	En étoile	Moyenne	Blanche	Lisse

7.2. Examen microscopique des isolats (coloration de Gram)

L'observation de la forme des cellules et de leurs arrangements a été réalisée avec un microscope optique au grossissement (x 1000), en additionnant l'huile à immersion, voire la figure 16



- Les bactéries *Staphylococcus*



- **Les bactéries *Bacillus***

Figure n°15 : Observation microscopique de la coloration de Gram (x 1000).

Les résultats obtenus par la coloration de Gram pour l'ensemble des 60 échantillons sont résumés dans le tableau qui suit : la majorité des bactéries sont des Gram positifs apparaissant sous différentes formes avec différents modes d'associations.

Tableau n°07 : Résultats de la coloration de Gram.

Echantillons	Types de bactéries	Arrangement
Echantillon 1 Colonie 1	Bacille à Gram +	en chaînette et en grappe de raisin
Echantillon 1 Colonie 2	Bacille à Gram -	En bâtonnets
Echantillon 1 Colonie 3	Colibacille à Gram -	En chaînettes
Echantillon 1 Colonie 4	Bacille à Gram -	en chaînette e
Echantillon 2 Colonie 1	Colibacille à Gram -	en chaînette
Echantillon 2 Colonie 2	Colibacille à Gram -	en chaînette
Echantillon 2 Colonie 3	Bacille à Gram +	en grappe de raisin et en chaînette
Echantillon 3 Colonie 1	Bacille à Gram +	en grappe
Echantillon 3 Colonie 2	Bacillus à Gram + et les spores claires	Bâtonnet
Echantillon 3 Colonie 3	Bacille à Gram +	en grappe de raisin et chaînette
Echantillon 3 Colonie 4	Bacille à Gram +	en amas et palissade
Echantillon 4 Colonie 1	Bacillus à Gram – et les spores claires	Bâtonnet
Echantillon 4 Colonie 2	Bacille long et court à Gram +	en grappe et en chaînette
Echantillon 4 Colonie 3	Staphylocoque à Gram -	en grappe et en chaînette
Echantillon 5 Colonie 1	Bacille à Gram +	en amas, en chaînette
Echantillon 5 Colonie 2	Staphylocoque à Gram +	En amas

Résultats et discussion

Echantillon 5 Colonie 3	Bacille à Gram -	En palissade et en amas
Echantillon 5 Colonie 4	Staphylocoque à Gram +	En amas (grappe de raisin)
Echantillon 5 Colonie 6	Bacille à Gram +	En amas
Echantillon 5 Colonie 7	Bacille et Cocci à Gram +	En amas
Echantillon 6 Colonie 1	Bacille à Gram -	Individuelle, en chaînette
Echantillon 6 Colonie 2	Bacille à Gram – et les spores claires	En bâtonnets
Echantillon 6 Colonie 3	Colibacille à Gram - et les spores claires	En bâtonnets, en Y
Echantillon 6 Colonie 4	Bacille à Gram + et les spores claires	En palissade, en bâtonnets
Echantillon 6 Colonie 5	Cocci à Gram +	En chaînette, en grappe
Echantillon 6 Colonie 6	Cocci à Gram +	En chaînette, en amas
Echantillon 6 Colonie 7	Cocci à Gram +	Diplocoques, en chaînette et en grappe
Echantillon 7 Colonie 1	Cocci à Gram +	Monocoques
Echantillon 7 Colonie 2	Bacille à Gram -	En bâtonnets, en amas
Echantillon 7 Colonie 3	Cocci à Gram -	En chaînette, en amas
Echantillon 7 Colonie 4	Cocci à Gram +	Diplocoques, en chaînette et en amas
Echantillon 7 Colonie 5	Cocci à Gram -	En chaînette, en amas
Echantillon 8 Colonie 1	Cocci à Gram +	En chaînette, en grappe
Echantillon 8 Colonie 2	Cocci à Gram -	En amas
Echantillon 8 Colonie 3	Cocci à Gram +	En amas
Echantillon 8 Colonie 4	Cocci à Gram -	En amas
Echantillon 9 Colonie 1	Cocci à Gram +	En grappe
Echantillon 9 Colonie 2	Bacille à Gram -	Individuelle, en chaînette et amas
Echantillon 9 Colonie 3	Bacille à Gram -	En bâtonnets
Echantillon 9 Colonie 4	Cocci à Gram -	En amas
Echantillon 9 Colonie 5	Cocci à Gram -	En chaînette, en amas
Echantillon 9 Colonie 6	Cocci à Gram +	En grappe
Echantillon 9 Colonie 7	Cocci à Gram -	Individuelle, en amas
Echantillon 9 Colonie 8	Cocci à Gram -	En amas
Echantillon 9 Colonie 9	Cocci à Gram +	En chaînette, en amas
Echantillon 10 Colonie 1	Bacille à Gram +	En palissade
Echantillon 10 Colonie 2	Cocci à Gram -	En chaînette, en amas
Echantillon 10 Colonie 3	Cocci à Gram +	En chaînette, en paire
Echantillon 10 Colonie 4	Cocci à Gram -	Individuelle, en paire et en chaînette
Echantillon 10 Colonie 5	Cocci à Gram +	En chaînette, en amas
Echantillon 11 Colonie 1	Cocci à Gram +	En grappe
Echantillon 11 Colonie 2	Cocci à Gram -	En amas
Echantillon 11 Colonie 3	Cocci à Gram +	En paire en chaînette
Echantillon 11 Colonie 4	Cocci à Gram +	En chaînette
Echantillon 12 Colonie 1	Bacille à Gram -	En chaînette

Echantillon 12 Colonie 2	Cocci à Gram +	En grappe et en chaînette
Echantillon 12 Colonie 3	Cocci à Gram +	En amas
Echantillon 12 Colonie 4	Cocci à Gram +	En chaînette, en amas
Echantillon 12 Colonie 5	Cocci à Gram +	En grappe, en paire deux
Echantillon 12 Colonie 6	Cocci à Gram +	En chaînette, en amas

Le travail mené a permis d'isoler 60 souches bactériennes à partir de 12 échantillons de lait de vache cru.

Des approches différentes mais complémentaires de microscopie et de tests biochimiques ont été utilisées pour l'identification de ces souches. Ainsi, l'utilisation de la coloration de Gram combinée à une observation microscopique suivie par une identification phénotypiques ont montré que 26 souches sont des Bacilles correspondant à 43,33 % des isolats et 34 souche sont des Cocci qui correspondent à 56,67%. La majorité de ces bactéries sont à Gram positif.

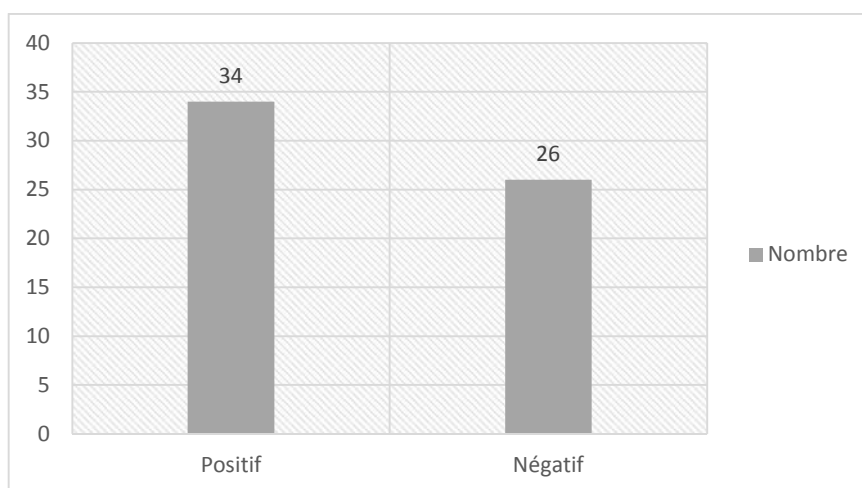


Figure n°16 : Répartition des souches selon leur Gram.

8. Identification de *Bacillus cereus* et *Staphylococcus Spp*

Après l'examen microscopique fait pour l'ensemble des souches isolées on s'est focaliser plus précisément sur la recherche de deux espèces ; *B.cereus* et *S.aureus*.

8.1. Identification de *Bacillus cereus*

L'identification préliminaire a permis de sélectionner 10 souches de genre *B.cereus*, qui seront ensuite ensemencées dans un milieu sélectif de Mossel.

L'aspect morphologique des isolats ayant présentés un résultat positif sur le milieu, un virage de la couleur du milieu vers le rose foncé a également été aperçu comme le démontre la figure, ce qui confirme que sont des souches de *Bacillus cereus*.

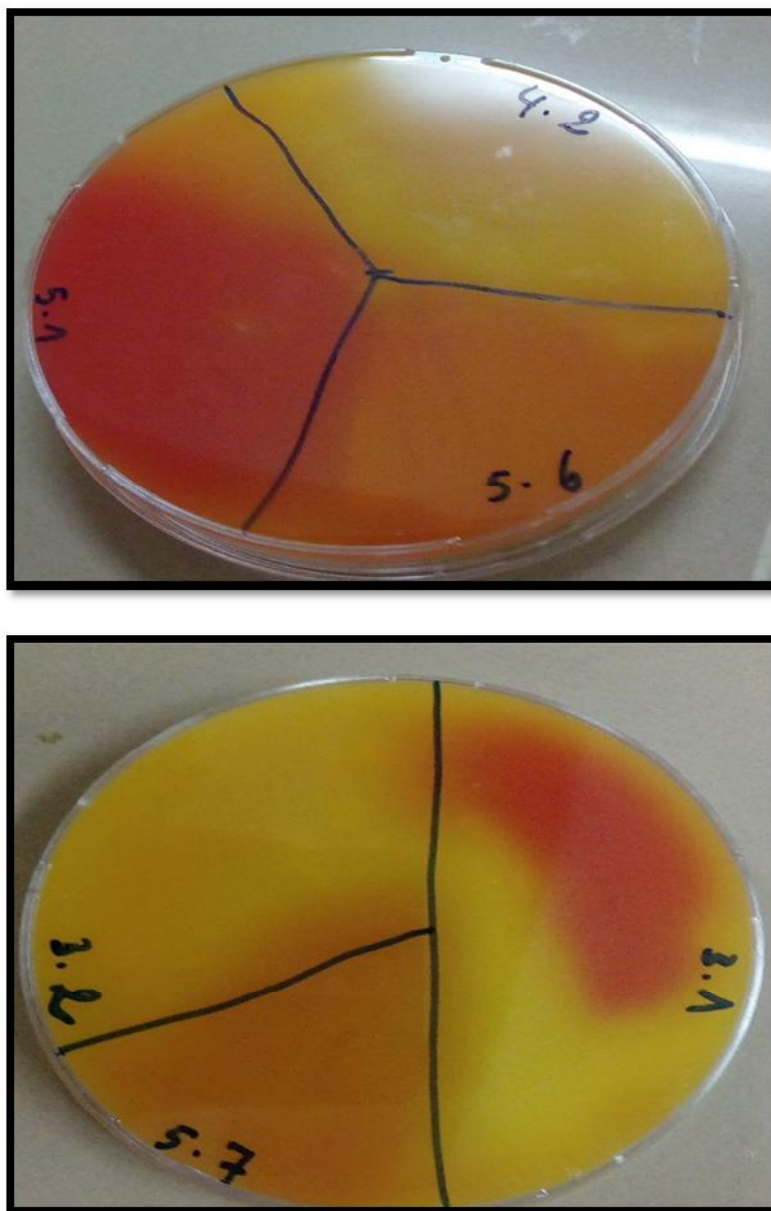


Figure n°17 : Aspect macroscopique de *Bacillus cereus* sur le milieu gélose de Mossel.

8.2. Identification de *Staphylococcus* spp

L'étude préliminaire a permis de sélectionner les souches de genre *Staphylococcus*. Après la confirmation du genre avec la coloration de Gram, l'identification est faite par des tests biochimiques. L'ensemencement est fait sur le milieu gélosé de Chapman, après incubation pendant 24h, les colonies apparaissent pigmentées (jaune doré). Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau suivant :

Tableau n°08 : Résultats des tests biochimiques obtenus pour les isolats des Staphylocoques.

Souches	Catalase	ADN ase	Coagulasse	Mannitol
S4	+	+	+	+
S8	+	+	+	+
S9	+	+	+	+
S10	+	+	+	+
S18	+	+	+	+
S21	+	+	+	+
S23	+	+	+	+
S'11	+	+	+	+
S'5	+	+	+	+
S'6	+	+	+	+
S'10	+	+	+	+
S1	+	-	-	-

Un travail réalisé en 2017 par **Bentiba** a consisté sur l'utilisation de 19 souches de *Staphylococcus spp* issu d'une collection de lait de vache au niveau de l'usine Arib-Ain Defla, et un autre travail fait en 2015 par **Didouh**, qui a consisté sur l'isolement et l'identification de 155 isolats parmi lesquels, 126 sont appartiennent au groupe *Bacillus cereus*. Ceci confirme donc que la bactérie *B.cereus* est répandue dans le lait de vache cru.

Au regard des résultats obtenus, le taux de contamination du lait par *S.aureus* et *B.cereus* est important, sachant que *B.cereus* est un germe qui se transmet par le mode de végétation des vaches.

Le *Staphylococcus aureus* est l'agent pathogène le plus fréquemment trouvé dans les infections de la peau et des tissus mous, c'est une bactérie très opportuniste. Un bon exemple de ces dires est fourni encore par **Marples et Kligman (1976)**. Ces derniers ont obtenus en 24h des infections très sévères da la peau. Chez l'homme, la gravité de l'infection à *S.aureus* est due à la sécrétion de toxines qui sont les déterminants clés de la virulence et l'absence du développement des réponses immunitaires protectrices (**Kim et al., 2014**).

Selon **Dodd et Booth (2000)**, le *Staphylococcus aureus* est considéré comme une bactérie pathogène majeure, causant des infections mammaires, ces dernières s'accompagnent d'une

augmentation de la perméabilité entre le compartiment sanguin et le lait qui a pour conséquence des modifications de la composition du lait (**Rainard et Poutrel, 1993**).

De nombreux travaux ont montré l'implication de *B.cereus* dans les intoxications alimentaires depuis plus de 40ans (**Mahler et al., 1997 ; Agata et al., 2002**). *B.cereus* est le plus souvent décrit comme agent de Toxi-infection alimentaire liée à la consommation des végétaux, produits amylacés liée aux syndromes émétiques et diarrhéiques d'origine alimentaire (**Yusuf et al., 1992 ; Rusul et Yaacob, 1995**). Ces microorganismes ne sont pas souhaités dans l'industrie alimentaire en raison de leur capacité de détérioration et de leur potentiel pathogène (**Zhou et al., 2008 ; Ankolekar et al., 2009**).

9. Activité antimicrobienne

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des composés phénoliques de l'extrait de *A. longa* est déterminée à partir de la solution mère et celle des dilutions allant de 1/2 jusqu'à 1/64, qui ont été préparées pour la détermination de diamètre des zones d'inhibition vis-à-vis des souches bactériennes.

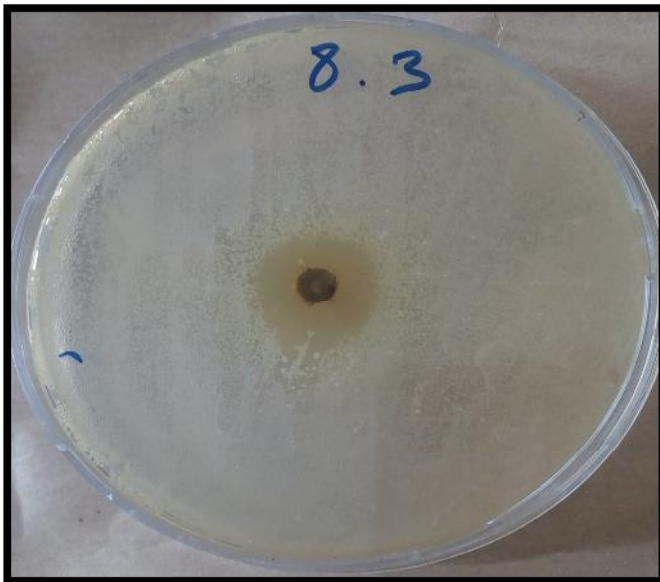
Cette activité est mise en évidence en utilisant la méthode de diffusion sur milieu gélose (MH), décrite par **Ponce et al., 2003**. Elle se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du disque de papier Wattman imprégné dans l'extrait.

Concernant les espèces bactériennes testées, nous remarquons qu'il y'a une différence de sensibilité parmi les souches qu'il s'agisse de Gram positif ou Gram négatif (les plus résistantes).

Il est connu que les bactéries à Gram négatif ont une membrane externe ce qui rend leur paroi cellulaire imperméable aux agents antimicrobiens (**Mariam et Abu-Al-basal, 2009**). Ainsi la paroi des Gram positif est composé uniquement du peptidoglycane ce qui les prédisposent a une importante sensibilité aux agents antimicrobiens (**Enwuru et al., 2008 ; Salman et al., 2008**).



Cocci à Gram -



Cocci à Gram +

Figure n°18 : Effet antibactériens de quelques souches

Les résultats des tests sont présentés dans le tableau.

Tableau n°09 : Diamètre des zones d'inhibitions des échantillons testés.

Souches bactériennes	Diamètres des zones d'inhibitions (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i>	12
<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	19
<i>Staphylococcus aureus</i>	8
<i>Bacillus cereus</i>	15
<i>Staphylococcus aureus</i>	9
<i>Staphylococcus aureus</i>	9
<i>Bacillus cereus</i>	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	11
<i>Staphylococcus aureus</i>	12
<i>Staphylococcus aureus</i>	17
<i>Staphylococcus aureus</i>	10
<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	9
<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	9
<i>Staphylococcus aureus</i>	8,2
<i>Staphylococcus aureus</i>	10
<i>Staphylococcus aureus</i>	10
<i>Staphylococcus aureus</i>	7

- : Signifie l'absence de la zone d'inhibition claire autour du disque.

L'activité antimicrobienne est déterminée en termes de diamètres de la zones d'inhibition produire autour des disques après 24h d'incubation à 37°C.

La sensibilité aux extraits est classée selon le diamètre des zones d'inhibition comme suit :

- D < 8 mm : bactéries non sensible ;
- 9 < D < 14 mm : bactéries sensible ;
- < D < 19 mm : bactéries très sensible ;
- D > 20 mm : bactéries extrêmement sensible (**Bouharb et al., 2014**)

Il ressort à travers l'observation des zones d'inhibitions, que pour la solution mère de l'extrait de feuilles de *A. longa*, que la plupart des souches bactériennes testées manifestent des zones d'inhibition, dont le diamètres varie de 7 à 19 mm, à l'exception chez quelques *Staphylococcus aureus*, et un *Bacillus cereus* qui révèle une absence de zone d'inhibition , et de ($\varnothing$ = 7mm et 8,2mm) marquée chez les *Staphylococcus aureus* , qui se révèle résistante vis-à-vis de l'extrait.

Une bonne activité antibactérienne est noté pour les bactéries à Gram positif plus précisément chez *Staphylococcus aureus*, avec une zone d'inhibition est de 19mm.

Nous avons constaté des zones d'inhibitions de 9 à 10 mm chez un *Bacillus cereus* et les *Staphylococcus aureus* qui sont également sensibles à l'extrait, et un diamètre de 11 à 12 mm marquées chez les *Staphylococcus aureus*.

L'extrait méthanolique d'*Aristolochia longa* avait un pouvoir inhibiteur élevé contre les deux germes testés. Ceci est conforme aux résultats rapportés par **Surendra Kumar et al., 2011**) sur l'extrait méthanolique d'*Aristolochia Indica*. En effet, il a été démontré que les différents extraits d'*A. indica* ont une activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* (**Murugan et Mohan., 2012**). Cette activité antibactérienne peut s'expliquer par la richesse d'*Aristolochie longa* dans les composés bioactifs. Dans ce contexte, des études prouvent l'activité biologique d'*Aristolochia longa* et leur richesse en composés bioactifs, démontrant qu'ils ont une bonne activité antibactérienne contre les bactéries à Gram positif. (**merouani et al., 2017**).

La différence de sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis des composés phénoliques qui possèdent des structures serait dû à la diffusion à travers la membrane microbienne, pénétration dans la cellule, inhibition de l'expression de l'ADN, la synthèse de certaines enzymes et protéines membranaires des microorganismes (**Ulanowska et al ., 2006 ; Ansari et al ., 2013**).

Il est connu que les bactéries à Gram négatif ont une membrane externe ce qui rend leur paroi cellulaire imperméable aux agents antimicrobiens (**Mariam et Abu-Al-basal, 2009**). Ainsi la paroi des Gram positif est composé uniquement du peptidoglycane ce qui les prédisposent a une importante sensibilité aux agents antimicrobiens (**Enwuru et al., 2008 ; Salman et al., 2008**).

Les plantes contenant des tanins et des flavonoïdes ont un large spectre d'activité antimicrobienne (**Benarba et al., 2014**)

Xiao et ses collaborateurs (2014) ont montré que les flavonoïdes sont parmi les plus communs des produits naturels qui présentent un large spectre d'activité antimicrobienne. Un nombre considérable de plantes médicinales contiennent des flavonoïdes, qui ont été rapportés par de nombreux auteurs comme ayant des propriétés antimicrobienne (**Malesev *et al.*, 2007**).

CONCLUSION



L'évaluation des plantes médicinales pour leurs activités biologiques a augmenté considérablement en Algérie. Ceci montre que les molécules isolées à partir des plantes médicinales sont certainement intéressantes pour être utilisées comme thérapie alternative ou comme modèle pour la synthèse de nouvelles substances.

Dans cette étude nous sommes intéressées aux feuilles d'*Aristolochia longa*, et à l'évaluation de la teneur en composés phénoliques, à savoir les polyphénols totaux, ainsi qu'une mise en évidence de la présence d'autres métabolites secondaires et l'étude de l'activité antimicrobienne de ces substances bioactive sur deux souches bactérienne : *S.aureus* et *B. cereus*. Ceci par l'extraction des polyphénols de l'extrait brut par macération dans le méthanol et l'acide formique.

Selon le screening phytochimique, les résultats obtenus nous permettent de déduire que l'emploi récurrent de cette plante serait le fait de la manifestation leur richesse relative en constituants polyphénoliques. Les résultats montrent la richesse de l'extrait de la partie aérienne d'*Aristolochia longa* par les composés bioactifs, notamment les tanins et les flavonoïdes.

L'extraction de la partie aérienne de plante (les feuilles) a permis d'obtenir un rendement de 12,6 % tandis que le dosage de polyphénols par la méthode de Folin-ciocalteu a donné un résultat de 1,0422 mg EAG/g.

Ainsi, on a réalisé un ensemble d'analyses microbiologiques sur les différentes souches de bactéries isolées à partir de 12 échantillons de lait de vache cru issu de trois régions différente dans le but d'identifier et caractériser les bactéries. On a pu isoler 60 souches.

L'étude de l'activité antimicrobienne de l'extrait d'*Aristolochia longa* a révélé que ceux-ci n'ont pas montré un grand effet sur les souches testées. Néanmoins la souche (*Staphylococcus aureus*), s'est révélée très sensible vis-à-vis de l'extrait méthanolique avec une zone d'inhibition de 19 mm. Par contre, la souche (*Bacillus cereus*), elle s'est révélée sensible avec une zone d'inhibition supérieure à 9 mm.

En perspective, ces résultats ne constituent qu'une petite partie dans le domaine de la recherche des antimicrobiens naturels. Il serait intéressant d'étayer ce travail par :

- De faire des travaux supplémentaires pour identifier et isoler les composés bioactifs en utilisant plusieurs techniques plus fine (CCM, HPLC...).
- D'approfondir les recherches sur les propriétés pharmacologiques d'*A.longa*.
- De faire des études in vivo pour évaluer d'autres propriétés : antioxydantes, biologiques à savoir anti-inflammatoires ; antimicrobiennes ; anticancéreuses etc...

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES



A

- **Abdelguerfi A., Ramdane S.A. (2003).** Plan d'Action et Stratégie National sur la Biodiversité, Tome XII : Evaluation des besoins en matière de renforcement des capacités nécessaires à la conservation et l'utilisation durable des la biodiversité importante pour l'agriculture. Document du FEM/PNUD, projet ALG/97/G31. Ministre de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement. Algérie.
- **Aguilera-Carvo A., Augur C., Prado-Barragan L.A., Favela-Torres E., et Aguilar C. N. (2008).** "Microbial production of ellagic acid and biodegradation of ellagitannins." *Applied microbiology and biotechnology*. 78(2) : 189-199.
- **Al-Bayati A. F., Khudir D. S. (2007).** In vitro activité antimicrobienne de *salvadora persica* L. Université de Mossoul. Irak. 57-62.
- **Andrade P., Ferreres F., Gil M. I., et Tomás-Barberán F.A. (1997).** "Determination of phenolic compounds in honeys with different floral origin by capillary zone electrophoresis. *Food Chemistry*. 60(1) : 79-84.
- **Angkawijaya A.E., DO Q.D., Tran-Nguyen P.L., Huynh L.H., Soetardejo F.E.,Ismadji S. et JU Y-H. (2014).** Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxydant activity of *Limnophila aromatica*. *Jornal of food and drug analysis*. 22 :296-302 .
- **Ankolekar C., Rahmati T, et Labbé R. (2009).** Detection of toxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* spores in U.S. rice .*Int.J.Food Microbiol*. 128 :460-466.
- **Ansari M., Zeeshan F. et Saif H. (2014).** Sesamol a natural phenolic compound high promising anticandidal potentiel. *Journal of Pathogens*. 10 : 1-12.
- **Ardekani M.R.S., Rahimi R., Javadi B., Abdi L., Khanavi M. (2011).** Relationship between Temperaments of Medicinal Plants and Their Major Chemical Compounds. *Journal of Traditional Chinese Medicine*. 31 : 27-31.
- **Aufrere J., Theodoridou K., and Baumont R. (2012).** "Valeur alimentaire pour les ruminants des légumineuses contenant des tannins condensés en milieux tempérés." *Productions Animales*. 25 : 1-29.
- **Avril J.L. et Monteil H. (2000).** *Bactériologie Clinique*. 3^e 2dition, Ed Ellipse, Paris. 1-2 : 6-39.
- **Avril J.L., Dabernat H. et Monteil H. (1992).** *Bactériologie clinique*. Ed Ellipse, Paris. 45-48.

B

- **Baba Aissa F. (1999).** Encyclopédie des plantes utiles, flore d'Algérie et du Maghreb, first Ed. Librairie moderne, Rouïba, Algérie.
- **Barbehenn R. V., Jones C. P., Hagerman A. E., Karonen M., et Salminen J.-P. (2006).** "Ellagitannins have greater oxidative activities than condensed tannins and galloyl glucoses at high pH: potential impact on caterpillars." *Journal of chemical ecology*. 32(10) : 2253-2267.
- **Belabbassi O. (2012).** Etude de l'effet de la polyploïdisation sur la teneur en hyoscyamine des chevelus racinaires de *Datura stramonium L.*
- **Benarba B., Boumedienne M. (2014).** Etude ethnobotanique, activité antifongique, criblage phytochimique et teneur phénolique totale de l'Algérie *Aristolochia longa*. *Journal Intercult Ethnopharmacol*. 3-4 : 150-154.
- **Benarba B., Pandiella A., Elmallah A. (2016).** Anticancer activity, phytochemical screening and acute toxicity evaluation of an aqueous extract of *Aristolochia longa L.*, *Int J Pharmaceut Phytopharmacol Res*. 6 : 20-26
- **Benarba B., Meddah B. (2014).** Ethnobotanical study, antifungal activity, phytochemical screening and total phenolic content of Algerian *Aristolochia longa*, *Intercult Ethnopharmacol*. 3 : 150-154.
- **Benkrief R. (1990).** Inventaire ethnobotanique des plantes médicinales de l'Est algérien:
Étude chimique de " *Hammada articulata*" (Moquin) Iljin ssp. scoparia Pomel. Etude chimique de 3 plantes néo-calédonniennes à monoterpénoïdes. Paris 5.
- **Benzakour G., Benkirane N., Amrani M., Oudghiri M. (2011).** Immunostimulatory potential of *Aristolochia longa L.* induced toxicity on liver, intestine and kidney in mice. *Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences*. 3 : 214-222.
- **Bernatova I., Kopincov, J., et Puzserova A. (2010).** "Chronic stress deteriorated nitric oxide production in Wistar rats exposed to a low dose of L-NAME." *Act Nerv Super Rediviva*. 52 : 3 : 200-205.
- **Bessaoud S. (2015).** Evaluation de quelques paramètres de la balance oxydants/antioxydants chez des rats diabétiques recevant de la quercétine.
- **Bhaaskaran C.T., Tamilselvi S., Bharathajothi P. (2014).** Antibacterial Activity of *Aristolochia bracteolata Lam.*, *Int J Innov ResDev*. 3 : 319-321.
- **Bonnet C., Legens F. et Zissler J. (2011).** *Aristolochia paucinervis* Pomel.

- **Bouharb H., El Badaoui K., Zair T., El amri J., Chakir S. et Alaoui T. (2014).** Sélection de quelques plantes médicinales du Zerhoun (Maroc centrale) pour l'activité antibactérienne contre *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Applied Biosciences. 78:6685-6693.
- **Brianceau S. n. (2015).** Vers une amélioration quantitative et qualitative de l'extraction des composés phénoliques du marc de raisin rouge à l'aide d'électrotechnologies, Compiègne.

C

- **Cadel S. S., De buyser M. et al. (2010).** Toxi-infections alimentaires collective à *Bacillus cereus* : bilan de la caractérisation des souches .Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation Spécial Risques alimentaires microbiologique. 50.
- **Carvalho O., Botelho C., Ferreira C., Ferreira H., Santos M., Diaz M., Oliveira T., Soares-Martins J., Almeida M., et Júnior A. S. (2013).** "In vitro inhibition of canine distemper virus by flavonoids and phenolic acids: implications of structural differences for antiviral design." Research in veterinary science. 95 :2 : 717-724.
- **Cherif HS., Saidi F., Boutoumi H., Rouibi A., Chaouia C. (2009).** Identification et caractérisation de quelques composés chimiques chez *Aristolochia longa L.* Agricultura-Stiinta si Paractica. 3-4 : 76-82.
- **CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). (2010).** Methods of Dilutions Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically : Approved Standard. Eighth Edition. Pennsylvania, USA.
 - **Cowan, M.M. (1999).** Plants products as antimicrobial agent. Clinical. Microbiology, Review. 12: 75-82.
- **Crozier A., Del Rio D. et Clifford M.N. (2006).** Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compound. Molecular Aspects of Medicine. 31 : 446-467.

D

- **Dagnara A.Y., Faye-Ketté H., Hounkpati A., David M., Dosso M. (2000).** Evaluation de deux tests d'identification de *Staphylococcus aureus*. Médecine et maladies infectieuses. 30 :533-9.
- **Dali Yahia M.K. (2017).** Etude photochimique bioguidée de plantes aromatique sahariennes. Thèse de doctorat .Université Abou Bekr Belkaid- Tlemcen.

- **Damian Rayna A.A., Gonzalez-Hernandez J-C et Chavez-Parga M.C. (2016).** Current procedures for extraction and purification of Citrus flavonoids current extraction of citrus. *Revue of Colombia. Technology.* 18 :1 :135-147.
- **Danielle Clave. (2014).** Bactériologie 143. Emis le 01 Décembre. 1sur 2.
- **Dao M., Sanou J., et Pare S. (2016).** "Maraichage urbain et semi-urbain de *Moringa oleifera* Lam. par des associations de femmes au Burkina Faso: contraintes et opportunités." [VertigO]. La revue électronique en sciences de l'environnement. 16 :1.
- **Debelle F., Vanherweghem J.L. et nortier J. (2009).** Néphropathie aux acides aristolochiques: de l'observation clinique au modèle expérimental. Flammarion Médecine Sciences –Actualités Néphrologiques. 188-200.
- **De Freitas V., Carvalho E., et Mateus N. (2003).** "Study of carbohydrate influence on protein–tannin aggregation by nephelometry." *Food Chemistry.* 81 :4 : 503-509.
- **Dibong S. D., Ottou P. B. M., Vandi D., Ndjib R. C., Tchamaha F. M., Mpondo E. M. (2015).** "Ethnobotanique des plantes médicinales anti hémorroïdaires des marchés et villages du Centre et du Littoral Cameroun." *Journal of Applied Biosciences.* 96 : 9072-9093.
- **Dodd FH. et Booth J. (2000).** Mastitis and milk production. Dans the healthy of dairy cattle. Edition Andrews A.H. London. 213-255.
- **Drame D. (2001).** Microméthode d'identification et d'étude de la sensibilité des entérobactéries : Intérêts thérapeutiques. Thèse Pharm. Dakar. 86.

E

- **El fertas-aissani R., Messai Y., alouache S., Bakour R. (2012).** Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens. *PATBIO* : 30-48.
- **El- Hilaly J., Hmamouchi M., Lyoussi B. (2003).** Ethnobotanical studies and economic evaluation of medicinal plants in Taounate province (Northern Mococco). *Journal of Ethnopharmacology.* 86 : 149-158.
- **El Kabouss A., Charrouf Z., Oumzil H., Faid M., Lamnaouer D., Miyata Y., et Miyahara K. (2011).** "Caractérisation des flavonoïdes des feuilles d'Arganier (*Argania spinosa* (L.) Skeels, Sapotaceae) et étude de leur activité antimicrobienne." *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires.* 21 :3 : 157-162.
- **El Rhaffari L., Hammani K., Benlyas M., Zaid A. (2002).** Traitement de la leishmaniose cutanée par la phytothérapie au Tafilalet. *Biologie & Santé.* 1 : 45-54.

- **Enari M., Sakahira H., Yakoyama H., Okaya K., Iwamatsu A., Nagata. (1998).** Acaspace-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*. 391 : 6662 : 43-50.
- **Evans W.C. (2009).** Treas and Evans' Pharmacognosy (16^e). Saunders Elsevier (Ed). London.

F

- **Ferrerres F., García- Viguera C., Tomás- Lorente F., et Tomás- Barberán F. A. (1993).** Hesperetin: A marker of the floral origin of citrus honey." *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 61 : 1 : 121-123.
- **Ferron A. (1983).** Bactériologie médicale. 12ème édition. LA MADELEINE. 88-135 p.
- **Flandrois J. P. (1997).** Bactériologie Médicale. Lyon : Presses Universitaires de Lyon. 107-180.
- **Fluck H. (1977).** Petit guide panoramique des herbes médicinales. Paris : Delachaux et Niestlé. 187.

G

- **Gang Z. (2010).** Isolation of bioactive compound from Ecuadorian *Aristolochia constricta*. Academic dissertation.Chiba University. Japan.
- **Georgé S., Brat P., Alter P. et Amiot M. J. (2005).** Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant- derived products. *Journal of agricultural and food chemistry*. 53:1370-1373.
- **Gerhardt P., Murray R.G.E., Wood W. A., Kring N.R. (1994).** Methods for general and Molecular Bacteriology. American society for Microbiology, Washington, D.C :791.
- **Ghazi N., Niar A. (2011).** Qualité hygiénique du lait cru de vache dans différents élevages da la wilaya de Tiaret(Algérie). *Tropicultura*. 29 : 4 : 193-196.
- **Ghedjati N. (2015).** Toxicité aigüe et subaigüe des alcaloïdes naturels et synthétiques des graines du *Datura stramonium*.
- **Gonz'alez- Tjjero M.R., Casares-Porcel M., S'anchez-Rojas C.P., Ramiro-Guti'errez J.M., Molero-Mesa J., Pieroni A., Giusti M.E., Censorii E., de Pasquale C., Della A., Paraskeva-Hadjichambi D., Hadjichambis A., Houmani Z., El-Demerdash M., El-Zayat M., Hmamouchi M., El-Johrig S. (2008).** Medicinal plants

in the Mediterranean area : Synthesis of the results of the project Rubia. *Journal of Ethnopharmacology*. 116 : 341-357.

- **Guiraud J.P. (1998).** Microbiologie des principaux produits alimentaires, in : *Microbiologie Alimentaire, Techniques de Laboratoire*. Dunod. Paris.
- **Guiraud J.P. (2003).** *Microbiologie Alimentaire*. Edition Dunod. Paris. 136-139.
- **Guitton Y. (2010).** Diversité des composés terpéniques volatils au sein du genre *Lavandula*: Aspects évolutifs et physiologiques, Université Jean Monnet-Saint-Etienne.

H

- **Halimi A. (2004).** Les plantes médicinales en Algérie .Ed Berti, Algérie. 201-202. (En arabe)
- **Hamiroune M., Berber A., Boubekour S. (2014).** Qualité bactériologique du lait cru de vaches locales et améliorées vendu dans les régions di Jijel et de Blida (Algérie) et impact sur la santé publique. *Annales de Médecine Vétérinaire*. 158 :137-144.
- **Harborne J.B. (1998).** *Phytochemical methods : a guide to modern techniques of plant analysis*. Chapman and Hall (Ed). London.
- **Hart T. et Shears P. (1997).** *Atlas de poche de microbiologie* 1ère édition Flammarion-médecine-science Paris. 71.
- **Hernandez Ochoa L. R. (2005).** Substitution de solvants et matières actives de synthèse par un combiné «solvant/actif» d'origine végétale, Institut National Polytechnique de Toulouse.
- **Hogan S ., Zhang L ., Li J ., Wang H., Zhou K . (2009).** Development of antioxydant rich peptides from milk protein by microbial proteases and analysis of their effects on lipid peroxidation in cooked beef .*Food chemistry*. 117 : 3 : 438-443.
- **Holzbach J.C., Lopes L.M.X. (2010).** Aristolactams and Alkamides of *Aristolochia gigantea*. *Molecules*. 15 : 9462-9472.

I

- **Ibn El-Baytar. F. (1982).** « الجامع لمفردات الادوية و الاغذية » volume 1, édition dar el dawa, beyrouth.179.

J

- **Jaradat N.A., Abualhassan M., Ali.I. (2015).** Comparaison of Antioxydant Activities and Exhaustive Extraction Yields between Wild and Ciltivated *Cyclamen persium*,

Malva sylvestris and *Urtica pilulifera* Leaves .Journal Applied Pharmaceutical science.
5 : 4 :101-106.

K

- **K'Eogh J., Scott M. (1986).** An Irish herbal : The Botanologia Universalis Hibernica, first ed. Aquarian Press, Wellingborough, Northamptonshire.
- **Kim HK, Missiakas D, Schneewind O. (2014).** Mouse models for infectious diseases caused by *Staphylococcus aureus*, J. Immunol.Methods. 84 :577-601.
- **Krief S. (2003).** Métabolites secondaires des plantes et comportement animal: surveillance sanitaire et observations de l'alimentation des chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées, Museum national d'histoire naturelle-MNHN PARIS.

L

- **Ladoh Yemeda C. F., Dibon S. D., Nyegue M. A., Djembissi Talla R. P., Lenta Ndjakou B., Mpondo E., Yinyang J., Wansi J. D. (2014).** Activité antioxydante des extraits méthanoliques de *Phragmanthera capitata* (Loranthaceae) récoltée sur *Citrus sinensis*. Journal of applied Bioscience. 84 : 7636-7643.
- **Lahsissene H., Kahouadji A., Tijane M., Hseini S. (2009).** Catalogue des plantes medecinales utilisees dans la région de Zaer (Maroc occidental). Lejeunia. 186, 1-26.
- **Levasseur-Garcia C., Kleiber D., et Surel O. (2013).** "Utilisation de la spectroscopie infrarouge comme élément d'aide à la décision pour la gestion du risque fongique et mycotoxique." Cahiers Agricultures. 22 : 3 : 216-227 : 1.
- **Lewis W.H., Elvin-Lewis M.F.P. (2003).** Medical Botany : Plants Affecting Human Health. N.J. Wiley, Hoboken.

M

- **Magalhães L., Ramos I., Reis S., et Segundo M. (2014).** "Antioxidant profile of commercial oenological tannins determined by multiple chemical assays." Australian Journal of Grape and Wine Research. 20 : 1 : 72-79.
- **Magnollides C. (2006).** Piperales : Aristolochiaceae, in Guia des Consultas Diversidad Vegetal. Ed. FACENA (UNNE). Argentina.
- **Mahler H., Pasi A., Kramer J.M., Schulte P., Scoging A.C., Bar W. et Krahenbuhl S. (1997).** Fulminant liver failure in association with emetic toxin of *Bacillus cereus*. N.Engl.J.Med. 336 :1142-1148.

- **Mahmoudi S., Khali M., et Mahmoudi, N. (2013).** "Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.)." *Nature & Technology*. 9 : 35.
- **Maire R. (1961).** « Flore de l'Afrique du nord » édition Paul Lechevalier, volume VIII, Paris. 216-221.
- **Makhloufi A. (2013).** Etude des activités antimicrobienne et antioxydante de deux plantes médicinales poussant à l'état spontané dans la région de Bechar (*Matricaria pubescens* (Desf.) et *Rosmarinus officinalis* L) et leur impact sur la conservation des dattes et du beurre cru.
- **Malešev D., et Kuntić V. (2007).** "Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions." *Journal of the Serbian chemical society*. 72 : 10 : 921-939.
- **Mangambu M., Mushagalusa K., et Kadima N. (2014).** "Contribution à l'étude photochimique de quelques plantes médicinales antidiabétiques de la ville de Bukavu et ses environs (Sud-Kivu, RD Congo)." *Journal of Applied Biosciences*. 75 : 1 : 62116220.
- **Manolaraki F. (2011).** Propriétés anthelminthiques du sainfoin (*Onobrychis viciifoliae*): Analyse des facteurs de variations et du rôle des composés phénoliques impliqués, Institut National Polytechnique de Toulouse.
- **Mansour L.M. (2015).** Etude de l'influence des pratiques d'élevage sur la qualité du lait : effet de l'alimentation. Thèse de doctorat en science agronomie. Université Ferhat Abbas Sétif. 123.
- **Marchal N., Bourdon J.L., Richard C. (1982).** Milieux et techniques réservés à l'étude de certains genres bactériens. In: *Les Milieux de Culture pour l'Isolement et l'Identification Biochimique des Bactéries*. Doind, Paris, France. 235- 248 :273-283.
- **Marcheix J., Fleuriet A., et Jay-Allemand C. (2005).** "Les composés phénoliques des végétaux."
- **Macheix, J.J., A. Fleuriet, A., Jay-Allemand, C. (2005).** Nature et diversité des composés phénoliques des végétaux. In : *Les composés phénoliques des végétaux*. Ed: Technique et documentation. Lavoisier. 10-15.
- **Marples R.R., Kligman A.M. (1976).** Experimental Staphylococcal infections of the skin in man. In J. Jeljaszewick (ed.), *Staphylococci and Staphylococcal diseases*. New York : Fischer Stuttgart. 955-960.

- **Medić-Šarić M., Jasprica I., Mornar A., Smolčić-Bubalo A., et Golja P. (2004).** "Quantitative analysis of flavonoids and phenolic acids in propolis by twodimensional thin layer chromatography." JPC-Journal of Planar ChromatographyModern TLC. 17 : 100 : 459-463.
- **Mehansho H., Butler L. G., et Carlson D. M. (1987).** "Dietary tannins and salivary proline-rich proteins: interactions, induction, and defense mechanisms." Annual review of nutrition. 7 : 1 : 423-440.
- **Merouani N., Belhattabe F.R., Sahli F. (2017).** Evaluation of the biological activity of *Aristolochia longa* L. Extracts, Int J Pharmaceut Sci Res. 8 : 1978-1992.
- **Merzougui I., et Tadj H. (2015).** Etude de l'effet antibactérien et antioxydant d'*Ammoides verticillata* De la région de Tlemcen.
- **Mesli-Bestaoul K., Bouazza M., Godron M. (2007).** Etude des groupements vegetaux des monts de Tlemcen et de leurs facies de dégradation par deux approches : les profils ecologiques et les liaisons interspecifiques (Oranie-Algerie). Sciences & Technologie C.25 : 71-78.
- **Mezouar D. (2013).** Recherche d'activités biologiques de *Berberis vulgaris*.
- **Monnier M. et Denis F. (2007).** Les Cocci Gram positif. In Bacteriologie Medicale. « Technique usuelles » par Carbonnelle B. Denis F, Marmonier A., Pinon G., et Vargues R. Ed SIMEP-Paris. 105-116.
- **Mole S., Rogler J. C., et Butler L. G. (1993).** "Growth reduction by dietary tannins: different effects due to different tannins." Biochemical systematics and ecology. 21 : 67 : 667-677.
- **Mostafa M. (2008).** The metabolism of terpenoides in caprins, AgroParisTech.
- **Moussa M. H. (2011).** Etude Analytique et Biologique des Flavonoïdes Naturels, Université Badji Mokhtar d'Annaba.
- **Mulder C. (2003).** Aristolochiaceae. Review of Palaeobotany and Palynology.123 : 47-55.
- **Murugan M., Mohan V.R. (2012).** Efficacy of different solvent extracts of *Vitex trifolia* L. and *Aristolochia indica* L. for potential antibacterial activity, Sci Res Repot. 2 :110-114.
- **Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen J.H., Landry M.L Pfaller M.A. (2007).** Manual of Clinical Microbiology (9th ed.) American Society of Microbiology Press.

- **Nawaz H., Shi J., Mittal G.S. et Kakuda Y. (2006).** Extraction of polyphénols from grape seeds and concentration by ultrafiltration. *Separation and Purification Technology*. 48 : 176-181 .

P

- **Paris M., Hurabielle M. (1981).** Abrégé de matière médicale, pharmacognosie 1. Ed, Paris ; New York ; Barcelone : Masson.
- **Peng J.S., Tsai W.C., Chou C.C. (2001).** Surface characteristics of *Bacillus cereus* and its adhesion to stainless steel. *International Journal of Food Microbiology*. 65 :105-111.
- **Pinheiro R. P. (2015).** "Caracterização química e efeitos farmacológicos de produtos derivados de *Palicourea rigida* Kunth (Rubiaceae)."

R

- **Rainard P et Poutrel B. (1993).** Protection de la glande mammaire. Dans : *Biologie de la lactation* .Edition INSERM-INRA. 415-429.
- **Rauter A.P., Branco I., Tostao Z., Pais M.S., Gonzalez A.G et Bermejo J.B. (1989).** Flavonoids from *Artemisia campestris* Subsp Maritima. *Phytochemistry*. 28 : 8: 2173-2175.
- **Ray C.G. (2004).** Enteric Infections and Food poisoning. In Ryan K.J et Ray C.G (eds.), *Sherris Medical Microbiology* (4th ed) :857-865.
- **Ribéreau-Gayon J., Peynaud E., Sudraud P et Ribéreau Gayon P. (1982).** Composés phénoliques, In *Traite d'œnologie, sciences et technique de vin*. Paris : Dunod.477-499.
- **Rice-Evans C., Miller N., et Paganga G. (1997).** "Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science*. 2 : 4 : 152-159.
- **Riou V., Vernhet A., Doco T., et Moutounet M. (2002).** "Aggregation of grape seed tannins in model wine effect of wine polysaccharides." *Food Hydrocolloids*. 16 : 1 : 17-23.
- **Royer M., Houde R., Viano Y., et Stevanovic T. (2012).** "Non-wood Forest Products Based on Extractives-A New Opportunity for the Canadian Forest Industry Part 1: Hardwood Forest Species. *Journal of Food Research*. 1 : 3 : 8.
- **Rulika B., Wanke S., Nuss M., Neinhuis C. (2008).** Pollination of *Aristolochia pallida* Willd. (Aristolochiaceae) in the Mediterranean. *Flora* .203 : 175-184.

S

- **Salhi S., Fadli M., Zidane L., Douira A. (2010).** Etude floristique et ethnobotanique des plantes médicinales de la ville de Kénitra (Maroc). LAZAROA. 31 :133-146.
- **Seaman G., Lowry L., et Frost K. (1982).** Foods of belukha whales (*Delphinapterus leucas*) in western Alaska: Biological Systems.
- **Sissao M., Millog V., Ouedraogo G.A. (2015).** Composition chimique et qualité bactériologique des laits crus et pasteurisé au Burkina Faso. Afrique science. 11 : 1 :142-154.
- **Srinivasan V.B., Vaidyanathan V., Mondal A. et Rajamohan G. (2012).** Role of the Two Component Signal Transduction System Cp x AR in Conferring Cefepime and Chloramphenicol Resistance in *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044. 7 : 4 : 33-777.
- **Surendra Kumar M., Rajeswari R., Astalakshmi N. (2011).** Evaluation of antimicrobial activities of *Aristolochia Indica* (Linn), Int J Pharm Pharmac Sci. 3 : 271-272.

T

- **Taleb A. (2003).** Fiche descriptive sur les zones humides Ramsar. Document de la DGF-MADR. Algérie.
- **Tepe B., Sokmen M., Akpulat HA., Sokmen A. (2006).** Screening of the antioxidant potential of six *Salvia* species from Turkey .Food chem. 95 :200.

U

- **Ulanowska K., Traczyk A., Konopa G. et Wegrzym G. (2006).** Differential antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of DNA, RNA and protein synthesis in some bacterial strains. Arch. Microbiol.184 : 5 : 271- 278.

V

- **Valnet J. (2001).** Phytothérapie, traitement des maladies par les plantes. 6ème édition Maloine, Paris. 712 pp.
- **Vandi D., Nga E. N., Betti J. L., Loe G. M. E., Ottou P. B. M., Priso R. J., Foze T. N., Boumsong P. C. N., Dibong S. D., et Mpondo E. M. (2016).** "Contribution des populations des villes de Yaoundé et Douala à la connaissance des plantes à tanins et à anthocyanes. Journal of Animal & Plant Sciences. 30 : 3 : 4797-4814.
- **Verykokidou-Vitsaropoulou E., et Vajias C. (1986).** "Methylated flavones from *Teucrium polium*." Planta medica. 52 : 5 : 401-402.

- **Vignola C. (2002).** Science et Technologie du Lait Transformation du lait. Edition Presses Internationales Polytechnique, Canada. 3-75.
- **V-G de Billerbeck. (2007).** Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques, phytothérapie. 5 : 249-253.
- **Vuong Q.V., Hirun S., Paul Droach., Michael C Bowyer. , Phoebe A., Phillips Christopher J. Et Scarlett. (2013).** Effect of extraction condition son total phenolic compound and antioxydant activities of *Caricapapaya leaf* aqueous extracts, Jornal of herbal medecine. 3 : 104-111 .

W

- **Wadood A., Ghufuran M., Baba Jamal S., Naeem M., Khan A., Ghaffar R. et Asnad. (2013).** Phytochemical Analysis of Medicinal Plants Occuring in Local Area of Mardan. Biochem Anal Biochem. 2 :1-4. Doi.org/10.4172/2161-1009.1000144.
- **Wanke S. (2006).** Evolution of the genus *Aristolochia*-systematics, molecular evolution and ecology. Dissertation, Technische Universita Dresden, Germany.
- **Wong J.C., Anderson A., Graham G.M., CHU M.C., Sauer M.V., Guarnaccia M.M. et Labo R.A. (2007).** The effect of cinnamon extract on insulin resistance parametres in polycystic ovary syndrome : a pilote study. Fertil Steril. 88 : 1 : 240-243.
- **Wu T-S., Damu AG., Su C-R., Kuo P-C. (2004).** Terpenoids of *Aristolochia* and their biological activities. Natural Products Reports. 21 :594-624 .

X

- **Xiao Z.T., Zhu Q et Zhang H.Y. (2014).** Identifying antibacterial targets of flavonoids by comparative genomics and molecular modeling. Open Journal of Genomics. 3.

Y

- **Yusuf I.Z., Umoh V.J. et Ahmad A.A. (1992).** Occurrence and survival of enterotoxigenic *Bacillus cereus* in some Nigerian flour-based foods. Food Control. 3 :149-152.

Z

- **Zhou G., Liu H., J.He.,Yuan Y.et Yuan Z. (2008).** The occurrence of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis* and *B.mycoides* in Chinese pasteunized full fat milk.Int.J.Food Microbiol. 121 :195-200.



Ecouvillons.

Ecouvillons.

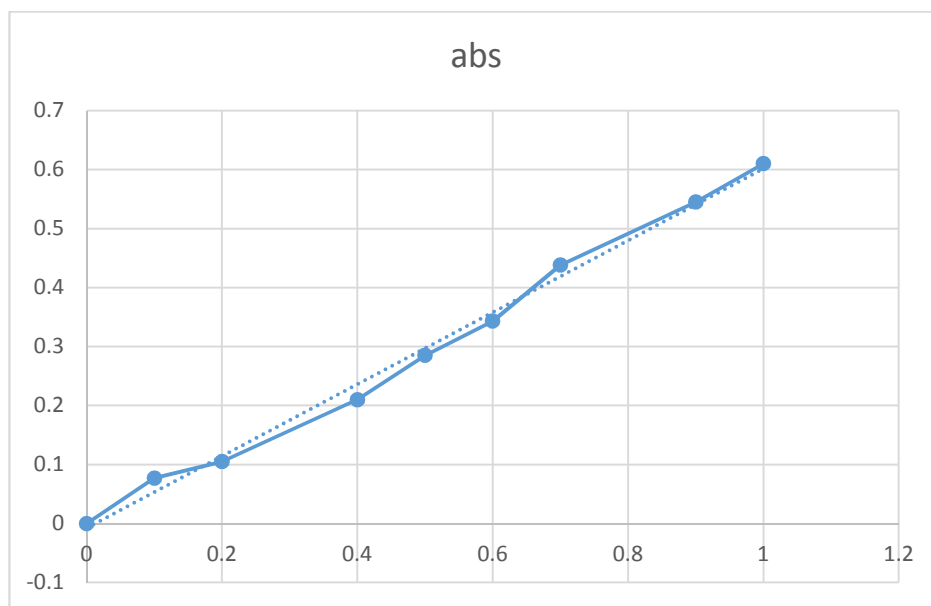


Figure: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.