

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Université Abdelhamid Ibn Badis

Mostaganem

Faculté des sciences De la Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميدا بن باديس
مستغانم
كلية العلوم الطبيعية و الحياة

DEPARTEMENT DES SCIENCES ALIMENTAIRES
MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

Présenté par :

Mme BENATI Fatima Zohra

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCES ALIMENTAIRES

Spécialité : Agro alimentaire et Contrôle de Qualité

Thème

Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne
de l'extrait hydroéthanolique de laurier noble (*Laurus
nobilis* L.) sur la souche pathogène de *Staphylococcus
aureus* (ATCC 33862)

Soutenu le :18/09/2022.

Devant le jury :

Président	Dr AIT SAADA D.	MCA	U. MOSTAGANEM
Encadrante	Dr AIT CHABANE O.	MCB	U. MOSTAGANEM
Examinatrice	Dr BELMAHDI F.	MCA	U.MOSTAGANEM
invitée	Dr FEKNOUS F.	MCA	U. MOSTAGANEM

Mémoire réalisé au laboratoire de recherche : Technologie Alimentaire et Nutrition

Année universitaire : 2021-2022

Remerciements

Je tiens à remercier:

- ❖ Mme BELMAHDI Faiza MCA à la faculté de SNV à l'université de Mostaganem, d'avoir accepté de présider le jury ;
- ❖ Mme AIT CHABANE Ouiza MCB à la faculté des SNV affilié à l'université de Mostaganem, pour avoir accepté de diriger ce travail ; pour sa constante disponibilité, malgré un emploi du temps chargé, sa vivacité d'esprit et sa rigueur scientifique ;
- ❖ Mr AIT SAADA Djamel MCA à la faculté des SNV affilié à l'université de Mostaganem, pour avoir accepté d'examiner ce modeste travail et faire partie du jury ;
- ❖ Mlle Feknous Ines, doctorante au laboratoire de Technologie Alimentaire et Nutrition à l'Université de Mostaganem pour ses fructueux conseils et coopération pour la réalisation de ce travail.
- ❖ Mme TADJOURI Houria et Melle MEHALLA Hafida pour leur précieuse orientation.



Dédicace

Je dédie ce modeste travail à mes chers parents, sources de mes joies et secret de ma force, vous serez toujours le modèle, à mon époux merci pour vos sacrifices. C'est à vous que je dois cette réussite.

À toute ma famille. À tous ceux qui m'aiment.



Résumé:

L'Algérie regorge de plantes aromatiques d'intérêt biologique qu'il serait intéressant de valoriser dans le secteur agroalimentaire. Dans ce travail, nous avons étudié l'extrait hydroéthanolique des feuilles de *Laurus nobilis* L. récoltées dans la région de « Tizi Ghénif », située au Sud-est de la wilaya de Tizi-Ouzou. D'abord, notre objectif a porté sur la quantification des polyphénols totaux et flavonoïdes, ainsi que l'évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait de cette plante. Ensuite, l'activité antibactérienne a été évaluée sur la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 33862, un des germes responsables de toxinfektions alimentaires.

Les résultats physicochimiques obtenus ont révélé une teneur en polyphénols de 25.33 ± 0.4 mg EAG/ml d'extrait. De même, la teneur des flavonoïdes est d'environ 13.01 ± 0.2 mg EQ/ml d'extrait. Concernant l'évaluation du pouvoir antioxydant par la méthode au DPPH*, elle a révélé que l'extrait peut agir en tant que bon piègeur des radicaux libres, avec une IC50 de 23.00 ± 1.7 µg E Vit C/ml d'extrait. Cette dernière est meilleure que celle de l'acide ascorbique utilisé comme témoin, qui est d'une valeur de 77.36 ± 0.3 µg E vit C/ml. L'effet antioxydant est hautement significatif ($p < 0.01$), avec un pouvoir Scavenger important, de l'ordre de 49.79 ± 0.10 µg E Vit C/ml d'extrait et un taux d'inhibition élevé de $85.78 \pm 0.2\%$. Sur le plan microbiologique, l'extrait présente une bonne activité antibactérienne, avec un diamètre d'inhibition allant de 10.67 à 18.67mm aux différentes concentrations de 20 à 100 mg/ml. Le rapport CMB/CMI est inférieur à 4 ce qui signifie que l'extrait a un pouvoir bactéricide sur la souche de *Staphylococcus aureus*. Des résultats obtenus, nous concluons que l'extrait hydroéthanolique des feuilles de laurier sauge pourrait être utilisé en tant qu'additif alimentaire de substitution aux additifs chimiques actuellement utilisés pour rallonger la vie des aliments. D'autres tests plus approfondis afin d'explorer cette piste sont nécessaires pour compléter cette étude.

Mots-clés : *Laurus nobilis* L., antioxydant, activité antibactérien, *Staphylococcus aureus*.

Abstrat:

Algeria is full of aromatic plants of biological interest that it would be interesting to develop in the agri-food sector. In this work, we studied the hydroethanolic extract of the leaves of *Laurus nobilis* L. harvested in the region of "Tizi Ghénif", located in the South-East of the wilaya of Tizi-Ouzou. First, our objective focused on the quantification of total polyphenols and flavonoids, as well as the evaluation of the antioxidant activity of the extract of this plant. Then, the antibacterial activity was evaluated on the *Staphylococcus aureus* strain ATCC 33862, one of the germs responsible for food poisoning.

The physicochemical results obtained revealed a polyphenol content of 25.33 ± 0.4 mg EAG/ml of extract. Similarly, the content of flavonoids is about 13.01 ± 0.2 mg EQ/ml of extract. Regarding the evaluation of the antioxidant power by the DPPH* method, it revealed that the extract can act as a good free radical scavenger, with an IC₅₀ of 23.00 ± 1.7 µg E Vit C / ml of extract. The latter is better than that of ascorbic acid used as a control, which has a value of 77.36 ± 0.3 µg E vit C/ml. The effect is highly significant ($p < 0.01$), with a high Scavenger power, around 49.79 ± 0.10 µg E Vit C/ml of extract and high inhibition rate of $85.78 \pm 0.2\%$. On the microbiological level, the extract has good antibacterial activity, with an inhibition diameter ranging from 10.67 to 18.67 mm at different concentrations from 20 to 100 mg/ml. The CMB/CMI ratio is less than 0.4 which means that the extract has a bactericidal power on the strain of *Staphylococcus aureus* studied. From the results obtained, we conclude that the hydroethanolic extract of bay leaves with sauce could be used as a food additive to replace the chemical additives currently used to extend the life of foods, other more in-depth tests to explore this track are needed to complete this study.

Keywords: *Laurus nobilis* L., antioxydant , antibacterial , *Staphylococcus aureus*.

ملخص :

الجزائر مليئة بالنباتات العطرية ذات الأهمية البيولوجية والتي سيكون من المثير للاهتمام تطويرها في قطاع الأغذية الزراعية. درسنا في هذا العمل المستخلص المائي الإيثاني لأوراق نبات الغار النبيل المحصود في منطقة "تيزيغينيف" الواقعة في الجنوب الشرقي من ولاية تيزي وزو. البوليفينول والفلافونويد ، وكذلك تقييم النشاط المضاد للأكسدة لمستخلص هذا النبات. بعد ذلك ، تم تقييم النشاط المضاد للبكتيريا على سلالة البكتيريا العنقودية الذهبية ATCC 33862 ، وهي إحدى الجراثيم المسؤولة عن التسمم الغذائي.

أظهرت النتائج الفيزيائية والكيميائية التي تم الحصول عليها محتوى البوليفينول 25.33 ± 0.4 ملغ معادل لحمض الغاليك / مل من المستخلص. وبالمثل ، فإن محتوى الفلافونويد حوالي 13.01 ± 0.2 ملغ من معادل ل 1 مل حمض الغاليك من المستخلص. فيما يتعلق بتقييم قوة مضادات الأكسدة بواسطة طريقة DPPH* ، فقد كشفت أن المستخلص يمكن أن يكون بمثابة كاسح جيد للجذور الحرة، مع تركيز IC بنسبة 23.00 ± 1.7 ميكروغرام من فيتامين ج / مل من المستخلص. هذا الأخير أفضل من حمض الأسكوربيك المستخدم كعنصر تحكم ، والذي تبلغ قيمته 77.36 ± 0.3 ميكروغرام E فيتامين ج / مل من المستخلص. التأثير ذو أهمية عالية ($p < 0.01$) ، مع قوة محاصرة عالية ، حوالي 49.79 ± 00.10 ميكروغرام من فيتامين ج / مل من المستخلص ونسبة تثبيط عالية تبلغ $85.78 \pm 0.2\%$. على المستوى الميكروبيولوجي ، يحتوي المستخلص على نشاط مضاد للجراثيم ، بقطر تثبيط يتراوح من 10.67 إلى 18.67 مم بتركيزات مختلفة من 20 إلى 100 مجم / مل. نسبة الحد الأدنى لإبادة البكتيريا /نسبة الحد الأدنى للتركيز أقل من 0.4 مما يعني أن المستخلص لديه قوة مبيد للجراثيم على سلالة البكتيريا العنقودية الذهبية. من النتائج التي تم الحصول عليها ، نستنتج أن المستخلص المائي الإيثاني لأوراق الغار مع الصلصة يمكن استخدامه كمضافات غذائية لتحل محل المضافات الكيميائية المستخدمة حاليًا لإطالة عمر الأطعمة ، وهناك حاجة إلى اختبارات أخرى أكثر عمقًا لاستكشاف هذا المسار من أجل أكمل هذه الدراسة.

الكلمات المفتاحية: الغار النبيل ، مضاد الأكسدة ، مضاد للبكتيريا ، البكتيريا العنقودية الذهبية .

LISTE DES TABLEAUX

Tableaux	N°
Tableau 1 . Différents métabolites secondaires identifiés dans le laurier sauce	04
Tableau 02. Classification taxonomique de l'espèce <i>S. aureus</i> (Gajdacs, 2020).	07
Tableau 03. Caractères biochimiques distinctifs de <i>Staphylococcus aureus</i> isolé chez l'homme.	08
Tableau 4. Caractéristiques d'une intoxication due à l'ingestion d'entérotoxines staphylococciques (Anses, 2011).	11
Tableau 05. Transcription des diamètres d'inhibition des disques imprégnés (Moreira et al. , 2005).	27
Tableau 06. Dosage des composés phénoliques dans l'extrait hydroéthanolique et la matière végétale brute des feuilles de laurier.	29
Tableau 08. Evaluation de l'activité antioxydante de l'extrait hydroéthanolique de <i>Laurus nobilis</i> L.	30
Tableau 09. Effets des concentrations de l'extrait hydroéthanolique de <i>Laurus nobilis</i> L. sur la croissance de <i>Staphylococcus aureus</i> .	32
Tableau 10. Effet de l'extrait hydroéthanolique de <i>Laurus nobilis</i> L. sur les variations des diamètres et des taux d'inhibition chez <i>Staphylococcus aureus</i>	33
Tableau 11. Evaluation de la CMI de l'extrait hydroéthanolique de <i>Laurus nobilis</i>	35
Tableau 12. Effet antimicrobien de l'extrait hydroéthanolique de <i>Laurus nobilis</i> L chez <i>Staphylococcus aureus</i> .	36

LISTE DES FIGURE

Figures	N°
Figure 01. Arbuste de <i>Laurus nobilis</i> L (Monaconatureencyclopédie, 2020)	01
Figure 02. Aspect morphologique de <i>Laurus nobilis</i> L. (Beloued, 2005)	02
Figure 03. Couronne de laurier sauce (Bernard, 2021)	03
Figure 04. Aspect microscopique des <i>Staphylococcus aureus</i> (www.aquaportail.com)	07
Figure 05. Aspect macroscopique de <i>Staphylococcus aureus</i> sur milieu au sang (www.fripik.com).	09
Figure 06. Aspect macroscopique de <i>Staphylococcus aureus</i> sur milieu Chapman. (www.microbiologie_medicale.fr)	09
Figure 07. Aspect macroscopique de <i>Staphylococcus aureus</i> sur milieu Baird Parker (https://microbiologie-clinique.com/Baird-Parker-Agar.html)	09
Figure 08. Génome de <i>S. aureus</i> -souche N315 résistante à la méticilline et souche Mu50 de sensibilité diminuée à la vancomycine (Kuroda et al., 2001)	13
Figure 09. Zone de récolte de <i>Laurus nobilis</i> L. (Google Earth)	18
Figure 10. Feuilles de <i>Laurus nobilis</i> L., avant et après séchage	18
Figure 11: Les étapes d'extraction des composés phénoliques de l'extrait de <i>Laurus nobilis</i> L	20
Figure12. Préparation de différentes solutions d'extrait de <i>Laurus nobilis</i> L	21
Figure 13. Dilutions de l'extrait de <i>Laurus nobilis</i> L	23
Figure 14. Mesure de la densité optique de l'inoculum	25
Figure 15. Méthode de contact direct	25
Figure 16. Préparation des disques d'aromatogramme	26
Figure 17. Effet des concentrations de l'extrait hydroéthanolique de <i>Laurus nobilis</i> L. sur la croissance de <i>Staphylococcus aureus</i>	31
Figure 18. Diamètres d'inhibition de <i>Staphylococcus aureus</i> par les différents antibiotiques et les concentrations de l'extrait de <i>Laurus nobilis</i> L	34
Figure 19. Evaluation de la CMB de l'extrait hydroéthanolique de <i>Laurus nobilis</i> L. chez <i>Staphylococcus aureus</i> .	36

LISTE DES ABREVIATIONS

AMC 30 µg	Amoxiciline + Acide Calvulanique
AMX 25 µg	Amoxiciline
ATCC	American Type Culture Collection
BCT30	Bactrime 30µg
CAZ 30	Ceftazidine
CHL	Chloramphénicol
CMB	Concentration Minimal Bactéricide
CMI	Concentration Minimal Inhibitrice
CN	Céalexine
IC50	Concentration Inhibitrice à 50%
Mh	Mueller Hinton
MS	Matière sèche
NAL 30 µg	Acide nalidixique
PVL	Leucocidine de Panton Valentine
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline
SCC <i>mec</i>	<i>Staphylococcal cassette chromosome mec</i>
UFC	Unité Formant Colonie
VAN	Vancomycine

Table de matières

Remerciement

Dédicace

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction

PARTIE 01 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Généralités sur le *Laurus nobilis* L.

1. Introduction	01
2. Description botanique	01
3. Classification et taxonomie.....	01
4. Habitat et culture	02
5. Histoire et tradition.....	02
6. Composition	03
7. Intérêt et utilisations	05

Chapitre II : L'espèce bactérienne *Staphylococcus aureus*

1. Généralités.....	06
2. Position Taxonomique et classification.....	06
3. Caractères bactériologiques.....	07
3.1 Caractères morphologiques.....	07
3.2 Caractères biochimiques.....	07
3.3 Caractères culturels.....	08
4. Toxi-infection alimentaire au <i>Staphylococcus aureus</i>	10
5. Résistance aux antibiotiques et plasticité génétique de <i>S. aureus</i>	12

PARTIE 0 2 : METHODOLOGIE EXPERIMENTALE

1. Objectif.....	18
2. Région de prélèvement et traitement préliminaire du matériel végétal.....	18
3. Matériel et produits utilisés.....	19
4. Procédé d'extraction des composés phénoliques.....	19
5. Préparation des solutions expérimentales de l'extrait.....	20
6. Etude des effets antioxydants de <i>Laurus nobilis</i> L.....	21
6.1 Composés phénoliques.....	21
6.2 Flavonoïdes.....	22
6.3 Activité antioxydante.....	22
7. Effet antimicrobien de <i>Laurus nobilis</i> L.....	22
7.1 Revivification et repiquage des souches microbiennes.....	24
8. Méthode de contact direct.....	25
9. Aromatogramme.....	26
10. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB).....	27
11. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB).....	28
12. Traitement statistique.....	28

I. RESULTATS

1. 1. Polyphénols totaux.....	29
1.2. Flavonoïdes.....	29
1.3. Activité antioxydante.....	30
1. 4. Test de croissance du germe pathogène <i>Staphylococcus aureus</i>	30
1.5 Diamètres d'inhibition.....	32
6. Concentration minimale inhibitrice (CMI)	35
7. Concentration minimale bactérienne (CMB).....	35
8. Rapport CMB/CMI.....	36

II .DISCUSSION

CONCLUSION

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

Introduction

Chapitre I

L'espèce Laurus nobilis L.

Introduction :

L'Algérie renferme une flore naturelle qui renferme une pléthore de plantes médicinales et aromatiques d'intérêt biologique. Toutefois, il y a eu très peu d'efforts consacrés au développement de leur utilisation et leur valorisation en tant qu'additifs d'intérêt dans les différents secteurs industriels : agroalimentaire, cosmétique et pharmaceutique.

En effet, ces plantes renferment des molécules telles que les composés phénoliques, dont l'efficacité a été prouvée contre divers agents microbiens et viraux ainsi qu'une forte activité anti-inflammatoire, antiallergique et anticancéreuse (**Muanda, 2010**).

A travers cette étude, nous nous sommes intéressés à l'étude d'une plante très largement répandue et utilisée traditionnellement comme condiment, non seulement en Algérie, mais sur tout le pourtour méditerranéen, le *Laurus nobilis* L. ou plus communément, le laurier sauce.

L'objectif du présent travail consiste en l'évaluation l'activité antioxydante des polyphénols contenus dans l'extrait hydroéthanolique des feuilles du laurier sauce, ainsi que son activité antibactérienne vis-à-vis de l'un des germes responsables de toxi-infections alimentaires, à savoir, le *Staphylococcus aureus*.

Pour réaliser ce travail, nous avons fait une extraction de type solide-liquide par macération sur des feuilles séchées et broyées dans un mélange solvant composé d'eau et d'éthanol, puis avons procédé à la caractérisation et quantification des polyphénols totaux et flavonoïdes totaux, avant de terminer par l'évaluation de l'effet antioxydant par la méthode au DPPH et de l'activité antibactérienne par la méthode de contact direct et diffusion sur gélose.

Ce mémoire comporte trois parties essentielles :

- La première partie est consacrée à la synthèse bibliographique regroupant des généralités sur la plante étudiée et le germe responsable sujet de l'étude.
- La deuxième partie est dédiée à la présentation du matériel et des protocoles expérimentaux utilisés.
- La troisième partie concerne la présentation des résultats des différents tests effectués ainsi que leur interprétation et discussion.

Partie I

Étude bibliographique

Chapitre I

L'espèce Laurus nobilis L.

Chapitre I : Généralités sur le *Laurus nobilis* L.

1. Introduction :

Laurus nobilis L., membre de la famille des lauracées, renferme 32 genres et environ 2000 à 2500 espèces (Barla et al., 2007). « *Laurus* » dérive du nom latin qui veut dire « toujours vert ».

Il est intéressant de noter que cette plante, qui était pendant longtemps employée dans la nourriture comme condiment et en médecine traditionnelle, recèle en effet, de nombreuses propriétés qui peuvent suggérer de nouvelles applications (Ferreira et al., 2006).

2. Description botanique :

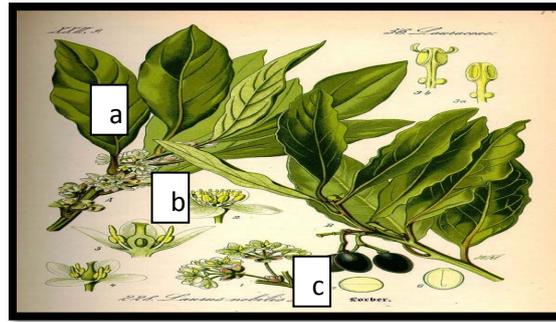
Laurus nobilis L. est un arbre ou un grand arbuste aromatique à écorce grise (Figure 01) atteignant 2 à 6 m de haut, voire 15 m à l'état sauvage. Afin de simplifier sa récolte, il est fréquemment taillé en arbrisseau. D'allure pyramidale, il présente un feuillage dense, vert foncé et persistant, à petites fleurs mâles et femelles jaunes et à baies noires vernissées. Sa croissance est généralement lente, d'environ 5 à 6 mètres en 20 ans. Il peut facilement devenir centenaire (Geerts et al., 2002).



Figure 01. Arbuste de *Laurus nobilis* L (Anonyme)

3. Classification et taxonomie

Le laurier sauce, *Laurus nobilis* L., appartient à la famille des Lauracées. Il est connu sous le nom de laurier-sauce ou laurier d'Apollon. La partie aérienne de la plante est constituée par les organes représentés dans la figure 2 ci-après :



a : Feuilles, **b** : Fleurs, **c** : Baies.

Figure 02. Aspect morphologique de *Laurus nobilis*L.

(Beloued, 2005).

La classification systématique de *Laurus nobilis* L. est la suivante :

- Règne Plantes
- Sous règne Plantes vasculaires
- Embranchement Spermaphytes
- Sous embranchement Angiospermes
- Classe Dicotylédones
- Sous classe Dialypétales
- Ordre Laurales
- Famille Lauracées
- Genre Laurus
- Espèce *Laurus nobilis* L.



(Quezel et Santa, 1962).

4. Habitat et culture :

Originnaire du bassin méditerranéen, le laurier sauce pousse dans les milieux humides et ombragés, mais également dans les jardins, où il est cultivé comme condiment. Les feuilles sont récoltées toute l'année (Iserin, 2001).

5. Histoire et tradition

Dès l'Antiquité, le laurier était cultivé par les Grecques et les Romains dans toutes les régions méditerranéennes. Les feuilles et les fleurs du laurier sont d'ailleurs citées dans un livre de recette par le gastronome romain Apicius « De re coquinaria ». Des représentations du laurier ont été retrouvées dans l'ancienne Pompéi (Teuscheret al, 2005).

En Grèce ancienne, l'oracle de Delphes utilisait le laurier dans ses rituels de divination.

A la même époque, les feuilles de laurier étaient un médicament, dans les civilisations grecque et romaine. Déjà il avait cette réputation de préserver contre les maladies, de purifier et de désinfecter l'air des propriétés antiseptiques que l'on utilise encore aujourd'hui.

Pendant les saturnales des fêtes célébrées au mois de décembre, le feuillage était tressé en guirlandes (**Figure 03**). Il y a aussi de très fortes superstitions, symboles et habitudes qui ont été créés au fil du temps autour du laurier. C'est l'arbre d'immortalité, c'est aussi le symbole de ceux qui triomphent, de la gloire et de la victoire. La couronne de laurier est souvent placée sur la tête des généraux romains après une victoire (**Bernard, 2021**).



Figure 03. Couronne de laurier noble (**Bernard, 2021**)

6. Composition :

De nombreuses études ont été réalisées pour la détermination de la composition chimique des feuilles de *Laurus nobilis* L. L'analyse des extraits a montré que cette espèce contient plusieurs constituants bioactifs très variables, à la fois qualitativement et quantitativement selon les provenances et la période de récolte (**Fiorini et al., 1998 ; Simic et al., 2003 ; Fang et al., 2005**). Les feuilles du laurier sauce contiennent une huile essentielle représentant 1 à 3 % du poids sec. Cette huile renferme 30 à 70 % de cinéol, ainsi que plusieurs composés terpéniques : linalol, géraniol, eugénol, pinène, terpinène, phellandrène (**Iserin 2001 ; Sayyah et al., 2002 ; Demir et al., 2004**)

Plusieurs flavonoïdes et leurs dérivés ont été déterminés dans les extraits de laurier comme les O-glycosides ou C-glycoside, catéchine, procyanidines et des anthocyanes. **Tanaka et al., 2006 ; Skerget et al., 2005**)

D'autres composés ont été également identifiés tels que les lactones sesquiterpéniques, les alcaloïdes aporphiniques, comme la cryptodrine ou l'actinodaphnine, ayant une activité

cytotoxique (Ouchikh et al.2011 ; Shamma et Guinaudeau, 1984 ; Cheminat et al., 1984).

De plus, Demo et al., 1998 ainsi que Gomez-Coronado et al.,2004 ont montré la richesse de ses feuilles en tocophérols (vitamine E), principalement le gamma tocophérol.

Tableau 1 .Différents métabolites secondaires identifiés dans le laurier sauce.

Parties étudiées	Famille	Nom des composés identifiés
Feuilles	Terpènes (Al-Kalaldehy et al., 2010)	Oxydes terpéniques : cinéol (40.91%). Monoterpénols : linalool(1.29%), terpinenol (1.55%). Phénols : méthyl eugénol(0.9%), eugénol(1.62%). Monoterpènes : sabinène(6.92%), bétapinène (4.55%), α -pinène(5.82%). Esters terpéniques : α -terpénylenacétate (5.86%), linalyl acétate (0.34%).
	Flavonoïdes (Marakov, 1971 ; Fiorini ,1998 ;Dias et al,2014)	Principalement la rutine, l'isoquercétine, l'hyperoside et kaempférol-3 rhamnosidet 3- arabinoside. Le kaempférol-3-rhamnoside, 2-p-coumaroyles, Quercétine,heptamethoxyflavone, isorhamnetin, O-rutinoside , luteolin 6-c-glucoside, (+)-catéchine.
	Acides phénoliques (Muñiz, et al.,2013)	Acide coumarique, acide 2-hydroxycinnamique, acide tannique (Yakhlef,2011). Acide phénylacrylique, carbonique, libre ou estérifié, fénulique, sinapique, gentisique et vanillique. (Barla et al., 2007).
	Sesquiterpènes Lactones (Topçu, 2009 ;Golmakani , 2008 ;Yoshikawa, 2000)	Ermantine, dehydrocostus lactone, costunolide, zaluzanin, reunosin, laureno biolidesantamarin, gazaniolide, spirafolid eampelopsisionoside, laurosides.
	Acides gras (Dias et al., 2014)	Acide caproïque, acide laurique,acide palmitique, acide palmitoléique, acide oléique
Fruits	Autre (Zhang,2011)	α tocophérol (vitamine E)
	Sesquiterpènes lactones (Cisero,1992)	Gazaniolide, costunolides antamarin, reynoside,11.13-dehydrosantoninspirafolide, lauroxepin.
	Alcaloïdes (Ferhat,2006)	Boldine, réticuline, isodomecicine, neolistine, actinodophnine, nor – isodomecistine, launobine, nandigérine, cryptodonine.
	Les acides gras (Castilho, 2005)	Acides gras saturés : palmitique, laurique, myristique, Acides gras insaturés : oléique, linoléique, palmitoléique, caprique.
	Anthocyanes (longo et Vasapollo, 2005)	Cyanidine 3-0-glucoside, Cyanidine 3-0-rutinoside, peonodin 3-0-rutinoside.

Le fruit contient 30 % d'acides gras et environ 1 % d'huiles essentielles constituées essentiellement de terpènes, sesquiterpènes, alcools et cétones (**Aromatothérapie, 02**). Les racines contiennent une huile essentielle constituée de divers monoterpènes et sesquiterpènes oxygénés ou non. Les fleurs du Laurier-sauce renferment également une huile essentielle contenant les composés suivants : β -caryophyllène, viridiflorène, β -élémane, germacradiénol, germacrène D (**Aromatothérapie, 02**).

7. Intérêt et utilisations :

Le laurier fait partie des plantes couramment utilisées dans la production des extraits aromatiques et d'huiles essentielles. Les feuilles dégagent une odeur aromatique caractéristique lorsqu'elles sont froissées. Cette plante condimentaire est très utilisée en industrie alimentaire dont surtout, les conserveries des poissons et en phytothérapie (**Simic et al., 2003**) Cette plante a aussi des applications importantes en médecine traditionnelle et représente récemment un sujet de recherche scientifique intéressant (**Siniat et al., 2003**), le laurier est principalement utilisé, par voie orale, dans le traitement symptomatique des troubles de l'appareil digestif supérieur tels que le ballonnement épigastrique, lenteur de la digestion, éructations et flatulence (**Iserin, 2001**). L'extrait aqueux est utilisé dans la médecine traditionnelle turque en tant qu'anti-hémorroïdal, antirhumatismal, diurétique et comme un antidote dans des morsures de serpent et pour le traitement du mal d'estomac (**Kivçak et Mert, 2002**). Elle compte parmi les meilleurs moyens d'éloigner les insectes gênants (**Demir et al., 2004 ; Beloued, 2005**).

En infusion, les feuilles de la plante sont consommées pour leurs effets révulsifs et toniques sur l'estomac et la vessie. Sous forme de cataplasme, elles peuvent aussi soulager les piqures de guêpes ou d'abeilles (**Iserin, 2007**).

Chapitre II

*L'espèce bactérienne
Staphylococcus aureus*

Chapitre II : L'espèce bactérienne *Staphylococcus aureus*

1. Généralités:

Certains aliments sont favorables au développement des Staphylocoques. Le germe est retrouvé préférentiellement dans les gâteaux à la crème, la charcuterie, les conserves de poissons, les plats cuisinés, les viandes et dérivés et les crèmes glacées. (**Gotfried, 2021**).

La contamination de ces différents aliments est due en général à des manipulations par des malades atteints de lésions staphylococciques ou par des porteurs de germes (**Bouza, 2009**). La maladie humaine d'origine alimentaire est une intoxication due à l'ingestion d'entérotoxines staphylococciques (protéines thermorésistantes préformées dans l'aliment, dans lequel *S. aureus* ou tout autre staphylocoque producteur de toxine staphylococcique (SE) fabriquées par les bactéries qui sont déjà présentes dans l'aliment contaminé (**Gotfried , 2021**).

Les bactéries sont présentes sur la peau et donc le risque d'une épidémie peut être très élevé si les professionnels du secteur alimentaire ne se lavent pas correctement les mains avant de toucher les aliments. Les bactéries peuvent se multiplier et produire des toxines dans les aliments insuffisamment cuits ou laissés à température ambiante. Malgré la contamination, de nombreux aliments ont un goût normal et une odeur normale (**Gotfried J. ,2021**).

Ces bactéries sont également isolées de l'environnement naturel (sol, eau douce et eau de mer, poussière, air), de l'environnement domestique de l'homme (cuisine, réfrigérateur), de l'environnement hospitalier et des ateliers de préparation alimentaire ainsi qu'à partir des denrées alimentaires. La peau et les muqueuses de l'homme ainsi que des animaux constituent l'habitat propre de *S. aureus* dont la présence dans l'environnement est vraisemblablement due à une contamination par ces derniers (**Shanson, 1981**).

2. Position Taxonomique et classification :

Selon la 9ème édition du Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2009, *Staphylococcus aureus* est classée parmi les bactéries à Gram positif, pauvres en Guanine-Cytosine.

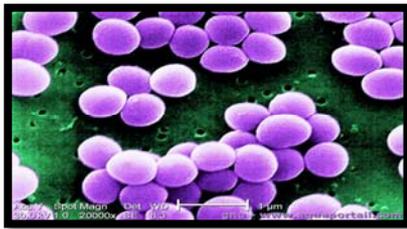
Tableau 02. Classification taxonomique de l'espèce *S. aureus* (Gajdacs, 2020).

➤ Règne	Bacteria
➤ Phylum	Firmicutes
➤ Classe	Bacilli
➤ Ordre	Bacillales
➤ Famille	Staphylococcaceae
➤ Genre	Staphylococcus
➤ Espèce	<i>Staphylococcus aureus</i>

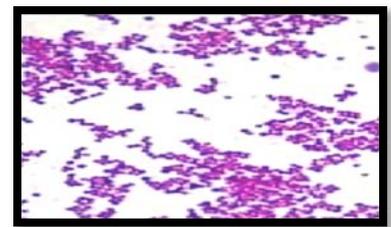
3. Caractères bactériologiques :

3.1 Caractères morphologiques :

Staphylococcus aureus se présente sous forme de coques à Gram positif, de taille comprise entre 0,5 et 1,5 µm de diamètre. Ils sont immobiles et non sporulés, apparaissant seuls, par paires ou en grappes irrégulières ressemblant à des grappes de raisin (Sato et al., 2019).



Aspect de *S. aureus* sous microscope électronique à balayage (X 20000)



Aspect de *S. aureus* sous microscope optique

Figure 04. Aspect microscopique des *Staphylococcus aureus* (www.aquaportail.com).

3.2 Caractères biochimiques :

Les souches de *S. aureus* ont un métabolisme aérobie prédominant et anaérobie facultatif, produisent une coagulase, une nucléase thermostable et une catalase mais pas d'oxydase (Touaitia, 2016).

Les *S. aureus* réduisent le tellurite de potassium les nitrates en nitrites et produisent de l'ammoniaque à partir de l'arginine (Freney et al., 1999).

La plupart des souches sont lipolytiques, produisant une zone opaque lorsqu'elles sont cultivées dans des milieux contenant le jaune d'œuf (**Ananthanarayan et Paniker, 2006**).

Tableau 03. Caractères biochimiques distinctifs de *Staphylococcus aureus* isolé chez l'homme.

Bactérie Caractères	<i>Staphylococcus aureus</i>
Coagulase	+
Glucose	+
Mannitol	+
Xylitol	-
Phosphatase	+
Dnase	+

3.3 Caractères culturels :

Les staphylocoques sont des bactéries peu exigeantes sur le plan nutritif et tolèrent de grandes variations (**Guiraud et Rosec, 2004**), peuvent être isolées en bouillon ou sur milieux solides simples tels que les milieux ordinaires, en aérobiose comme en anaérobiose, dans des températures de 7°C à 48°C, avec un optimum de croissance de 35°C et un pH préféré de 7 à 7,5 mais peuvent aussi se multiplier à un pH de moins de 4,5 (**Di Giannatale et al., 2011**).

En milieu liquide, la culture est rapide, en quelques heures, sans production de pigments, un trouble homogène puis un dépôt sont observés (**Ananthanarayan et Paniker, 2006**).

Sur milieux solides, les colonies observées après 24 heures d'incubation sont larges, de 2 à 4 mm de diamètre, circulaires, légèrement bombées, lisses et luisantes. La pigmentation des colonies peut varier du blanc au jaune, au jaune orangé (**Denis et poly, 2007**).

Certains milieux de culture peuvent être utilisés soit dans un but sélectif, soit dans un but d'identification directe. Nous retrouvons notamment :

- Gélose au sang : les souches typiques de *S. aureus* peuvent produire des colonies de plus grands diamètres que celles produites sur gélose nutritive (**Figure 05**) et de couleur jaune doré, entourées d'une hémolyse bêta (**Couture, 1990 ; Denis et Poly, 2007**).

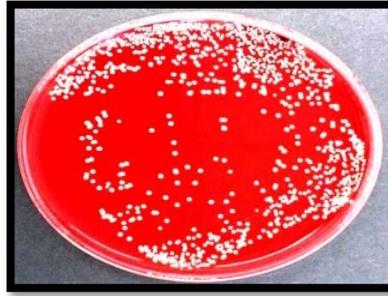


Figure 05. Aspect macroscopique de *Staphylococcus aureus* sur milieu au sang (www.fripik.com).

- Milieu Chapman : c'est un milieu sélectif, gélosé, hypersalé à 7.5 % de Na Cl et qui contient du mannitol. Il permet une culture abondante de *S. aureus* après une incubation de 24 à 48 heures. Les colonies sont alors entourées d'un halo jaune puisqu'elles fermentent le mannitol (**Figure 06**). La poussée sur ce milieu ne constitue qu'une indication puisque d'autres germes tels que les entérocoques ou les *Proteus*, peuvent être cultivés (**Le Minor et Veron, 1990**).



Figure 06. Aspect macroscopique de *Staphylococcus aureus* sur milieu Chapman. (www.microbiologie_medicale.fr)

- Milieu Baird Parker : le plus utilisé en bactériologie alimentaire. Il est à base de tellurite de potassium et de jaune d'œuf. *S. aureus* s'y présente après incubation sous forme de colonies noires (réduction du tellurite) avec un halo claire autour (protéolyse) (**Ananthanarayan et Paniker, 2006 ; Denis et Poly, 2007**).

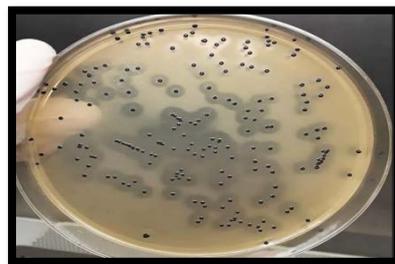


Figure 07. Aspect macroscopique de *Staphylococcus aureus* sur milieu Baird Parker (<https://microbiologie-clinique.com/Baird-Parker-Agar.html>)

4. Toxi-infection alimentaire au *Staphylococcus aureus*:

Staphylococcus aureus est une bactérie couramment trouvée sur les êtres humains et les animaux. Elle peut produire des toxines qui entraînent souvent un empoisonnement alimentaire. L'intoxication alimentaire staphylococcique est une intoxication qui commence abruptement et parfois violemment. L'intoxication alimentaire staphylococcique est très répandue et survient fréquemment (**Anonyme, 03**).

Les staphylocoques se multiplient plus facilement et rapidement lorsque la température ambiante est aux environs de 30°C. Cette multiplication s'accompagne de l'élaboration d'une entérotoxine thermostable, résistant à une température de 100°C pendant 30 minutes et responsable de troubles digestifs (**Anses, 2011**).

Plus les germes sont nombreux, plus la quantité de toxine élaborée est importante et plus la symptomatologie sera marquée chez le consommateur. Les troubles apparaissent brutalement, 2 à 3 heures après l'ingestion et ne sont pas accompagnés de fièvre. Les signes digestifs et généraux sont très marqués, parfois impressionnants : pouls rapide, chute de tension, hypothermie, vomissements incoercibles, diarrhée importante,... etc (**Tableau 4**).

Dans des conditions thermiques favorables, il ne faut parfois que quelques heures pour rendre un produit très dangereux à la consommation. Sa conservation au froid diminuerait les risques de toxi-infection car la croissance bactérienne est stoppée à basse température (**Buyser, 1985**).

Tableau 4. Caractéristiques d'une intoxication due à l'ingestion d'entérotoxines staphylococciques (Anses, 2011).

Durée moyenne d'incubation	Population cible	Principaux symptômes	Durée des symptômes	Durée de la période contagieuse	Complications	Portage de staphylocoques producteurs de SE
30 min - 8 h (3 h en moyenne)	Toute la population, en toutes classes d'âge confondues	- Nausées suivies de vomissements caractéristiques incoercibles (vomissements en fusées). - Douleurs abdominales. - Diarrhées. - Vertiges. - Frissons. - Faiblesse générale parfois accompagnée d'une fièvre modérée. - Lors des cas les plus sévères, des maux de tête, une prostration et une hypotension ont été rapportés.	18 - 24 h Les diarrhées et la faiblesse générale peuvent durer 24 heures et plus.	- Entérotoxines non transmissibles de personne à personne. - Aucune contagiosité.	- La mortalité reste exceptionnelle (taux de mortalité : 0,02 %). atteignant les individus les plus sensibles à la déshydratation (nourrissons et personnes âgées) et les personnes atteintes d'une pathologie sous-jacente. - Taux d'hospitalisation estimé : 16 % dans le cas où l'agent a été confirmé	- Portage intestinal 20-30 % des adultes. - Portage nasal : 20-55 % (37 % en moyenne) des adultes. - Portage manuel : 10 % du personnel hospitalier ou du personnel d'une chaîne de restauration.

5. Résistance aux antibiotiques et plasticité génétique de *S. aureus* :

Staphylococcus aureus est un pathogène redoutable qui a su développer des résistances à chaque nouvel antibiotique introduit depuis un demi-siècle. La plasticité de son génome lui confère la capacité de s'adapter à toutes les conditions environnementales, et notamment d'acquérir des gènes de résistance aux antibiotiques et de développer des mécanismes de régulation pour s'adapter à des concentrations croissantes d'antibiotiques (**Benhamou et al., 2005**).

Ainsi, dès 1941 sont apparus les staphylocoques résistants à la pénicilline, grâce à l'acquisition d'une pénicillinase plasmidique, enzyme dégradant la pénicilline. La résistance à la pénicilline, initialement restreinte au milieu hospitalier, a très vite diffusé en milieu communautaire et concerne actuellement plus de 90 % des souches de *S. Aureus* (**Benhamou et al., 2005**).

Pendant les années 1950 sont apparues les souches de *S. aureus* multi résistantes : à la résistance à la pénicilline était associée la résistance à la streptomycine, à l'érythromycine, à la tétracycline, au chloramphénicol ainsi qu'aux sulfamides (**Shanson, 1981**).

L'introduction en 1959 de la méticilline, pour le traitement des infections staphylococciques a soulevé un grand espoir. Mais à peine un an plus tard, les premières souches hospitalières de *S. aureus* résistantes à la méticilline sont apparues (**Oliveira et al., 2002**).

Le secret de ce pouvoir d'adaptation a été partiellement percé par le séquençage du génome de *S. aureus* effectué par les équipes de Baba et d'Hiramatsu (**Kuroda et al., 2001**). Le génome de *S. aureus* est formé de deux domaines fonctionnels distincts. La majeure partie du chromosome contient les gènes qui assurent la maintenance de la bactérie. La deuxième partie du génome est constituée d'éléments génétiques accessoires et mobiles comme des plasmides, transposons, prophages ou des îlots de pathogénie portant la plupart des gènes associés à des facteurs de virulence et à la résistance aux antibiotiques (**Bukharie et al. , 2001 ; Ito et al.,2003**) (**Figure 08**).

Ainsi, en dehors des mutations spontanées, *S. aureus* diversifie son génome grâce aux échanges de matériel génétique avec d'autres espèces bactériennes par des phénomènes de transfert horizontal de gènes. Le phénotype de résistance, comme le profil pathogénique, semble donc bien être déterminé par les combinaisons de ces éléments génétiques accessoires portés par le chromosome (**Ton-That, 1998**).

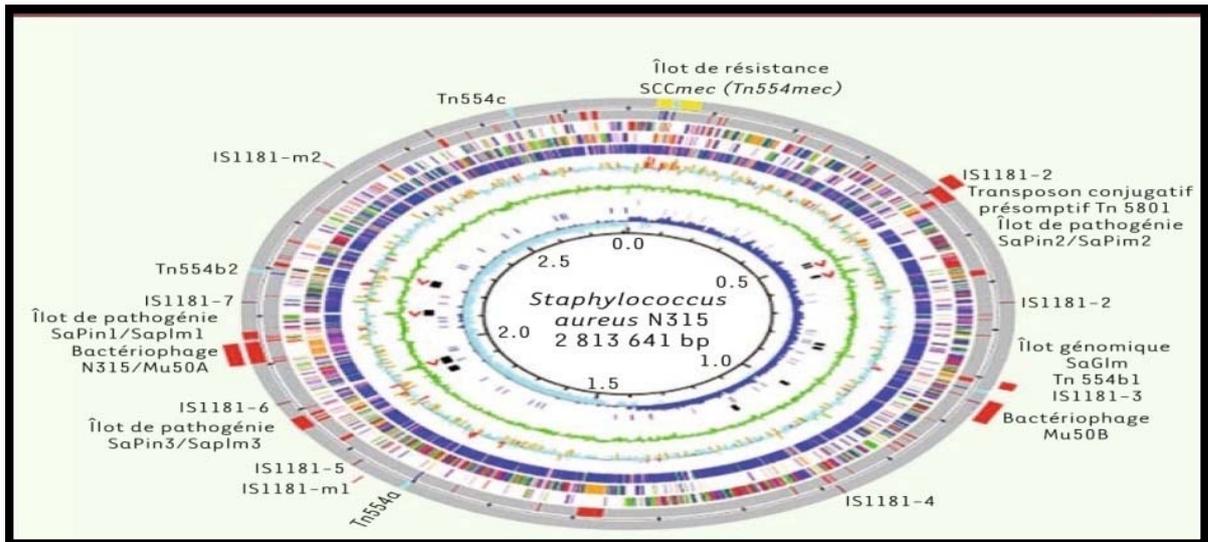


Figure 08. Génome de *S. aureus*-souche N315 résistante à la méticilline et souche Mu50 de sensibilité diminuée à la vancomycine (**Kuroda et al., 2001**).

- Les éléments spécifiques à Mu50 (96 % d'homologie avec la N315) et les éléments génétiques mobiles sont représentés au-delà du cercle extérieur: la cassette *SCCmec* en jaune, le transposon Tn554 en bleu clair, les phages et îlots de pathogénie en rouge, les séquences d'insertion IS1181 en marron.

En conclusion, le choix de l'antibiothérapie doit être réfléchi en fonction de la souche en cause, de la localisation et de la gravité de l'infection, du niveau d'immunocompétence et d'éventuelles allergies du patient.

Partie II

Méthodologie

Partie 2 : Méthodologie expérimentale.

1. Objectif:

Cette étude vise à tester l'activité antibactérienne et le pouvoir antioxydant de l'extrait hydroéthanolique de *Laurus nobilis* L. sur un des germes pathogènes de la flore de contamination alimentaire, à savoir le *Staphylococcus aureus*.

2. Région de prélèvement et traitement préliminaire du matériel végétal :

Les feuilles de la plante objet de l'étude, le laurier sauce, sont originaires de la région de «Tizi Ghenif», située au Sud - est de la wilaya de Tizi Ouzou (**Figure 09**).



Figure 09. Zone de récolte de *Laurus nobilis* L. (*Google Earth*).

La collecte des feuilles a été réalisée manuellement au mois de décembre 2021. Au laboratoire, les feuilles ont d'abord été séchées à l'air libre, à l'abri de la lumière pendant plusieurs jours, puis broyées par un mixeur de cuisine et entreposées dans des flacons ombrés, dans un endroit sec et à l'obscurité (**Figure 10**).

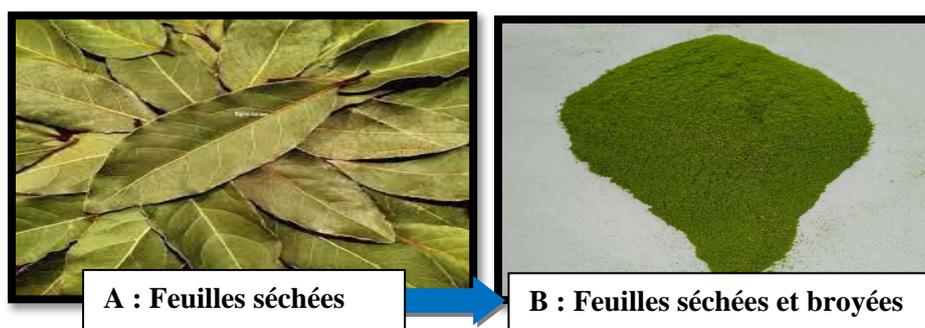


Figure 10. Feuilles de *Laurus nobilis* L., avant et après séchage.

3. Matériel et produits utilisés :

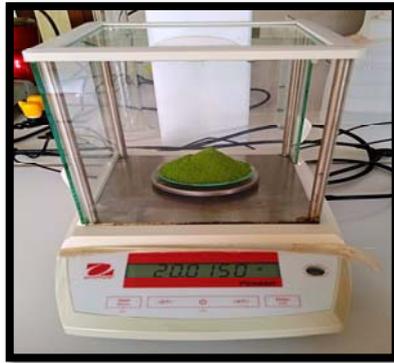
- Verrerie : Tubes à essais, béchers, erlenmeyer, pipette Pasteur, pipette graduée, fioles, flacons, entonnoir, verre de montre.
- Autre matériel : Boîtes de pétri, pro-pipettes, papier filtre stérile wattman n°1, anse à platine, écouvillons, disques en papier stériles (3mm), bec Bunsen, micropipette, tuyauterie diverse.
- Appareils: Balance, rota vapeur, pompe à vide, étuve, autoclave, plaque chauffante, bain marie, spectrophotomètre, vortex.
- Milieux de culture : Gélose Muller Hinton, bouillon Muller Hinton, bouillon nutritif (**Annexe 01**).
- Solvants : Ethanol, méthanol.
- Réactifs et étalons : DPPH, Folin Ciocalteu, quercétine, acide ascorbique, acide gallique.
- Matériel microbien étudié : *Staphylococcus aureus* ATCC 33862 conservé à 4°C dans un milieu gélosé.

4. Procédé d'extraction des composés phénoliques :

L'extraction des composés phénoliques des feuilles de laurier a été réalisée par la méthode décrite par **Sultana et al. en 2009**. Le principe de ce procédé consiste en une extraction solide liquide, par macération de la matière végétale dans un solvant aqueux à température ambiante durant un temps donné. Les constituants solubles sont récupérés après filtration et évaporation du solvant sous vide (**Figure 11 ; Annexe 02**).

➤ Mode opératoire :

- ✓ Une prise d'échantillon de 10g de matière végétale broyée a été mélangée avec 100 ml de solvant aqueux (80/20, solvant/eau).
- ✓ Le mélange est laissé macérer pendant 6 heures à température ambiante sous agitation, à l'abri de la lumière et de l'air.
- ✓ Le mélange est filtré sur papier Whatman à porosité de 0.1 µm.
- ✓ Le filtrat a été évaporé sous vide à 40°C par rotavapeur BUCHİ.
- ✓ L'extrait hydraulique obtenu est conservé à 4°C dans un flacon opaque, fermé hermétiquement pour le préserver de l'air et de la lumière jusqu'à son utilisation ultérieure.



a. Pesée



b. Agitation



c. Filtration



d. Evaporation



e. Extrait hydroéthanolique de *Laurus nobilis* L.

Figure 11: Les étapes d'extraction des composés phénoliques de l'extrait de *Laurus nobilis* L.

5. Préparation des solutions expérimentales de l'extrait :

L'extrait pur riche en composés bioactifs récupéré a été dilué à l'eau distillée stérile à des taux variables de 0, 20, 40, 60, 80 et 100%, respectivement (Figure 12 ; Annexe 03).



Figure12. Préparation de différentes solutions d'extrait de *Laurus nobilis* L.

6. Etude des effets antioxydants de *Laurus nobilis* L. :

6.1 Composés phénoliques:

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué selon la méthode de **Singleton et al. , 1999**, au réactif de Folin Ciocalteu. L'acide gallique a été utilisé comme étalon.

Ce dosage est basé sur la quantification de la concentration totale de groupements hydroxyles présents dans l'extrait.

Le réactif de Folin Ciocalteu au consiste en une solution jaune acide contenant un complexe polymérique d'ions (hétéropolyacides). En milieu alcalin, le réactif de Folin Ciocalteu, oxyde les phénols en ions phénolates et réduit partiellement ses hétéropolyacides, d'où la formation d'un complexe bleu (**Adesegun et al, 2007**).

Mode opératoire :

- ✓ Préparation de la solution d'acide gallique 0.01% pour la courbe d'étalonnage.
 - ✓ A partir de la solution mère d'acide gallique préparer des solutions filles (diluer à l'eau distillée) en 03 répétitions.
 - ✓ Prendre 1ml d'extrait de l'échantillon et préparer des dilutions isotopiques (diluer au solvant éthanol + eau) en 03 répétitions.
 - ✓ Ajouter 5 ml du réactif de Folin Ciocalteu (dilué dix fois), puis 4ml d'une solution de bicarbonate de sodium (7.5%) à l'ensemble des solutions.
 - ✓ Agiter vigoureusement puis incuber le mélange des solutions pendant 1heure à une température ambiante et à l'obscurité.
- ✓ La lecture au spectrophotomètre UV est réalisée à une longueur d'onde de 760 nm. La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (0-200 µg/ml) et les résultats exprimés en

milligramme équivalent acide gallique par ml d'extrait (mg EAG/ml EX).

6.2 Flavonoïdes: (Pekal et Pyrzynska ,2014)

Les flavonoïdes contenus dans l'extrait du laurier ont été estimés par la méthode **Pekal et Pyrzynska, 2014** au $AlCl_3$. 01 ml de solution méthanolique d' $AlCl_3$ (2 %, p/v) a été mélangé à un ml d'extrait hydroéthanolique. Après 10 min d'incubation, la densité optique a été enregistrée à 430 nm contre un blanc (mélange d'un volume d'une solution d'extrait et d'un volume de méthanol). L'extrait de la plante a subi une analyse en trois répétitions. Les quantités de flavonoïdes dans les extraits végétaux ont été exprimées en mg équivalent quercétine par ml d'extrait (mg EQ/ ml E) en se référant à une courbe d'étalonnage (**Amari et al., 2014**).

Mode opératoire :

- ✓ 1ml d'une solution méthanolique d' $AlCl_3$ (2%) est rajouté à 01 ml de l'extrait de la plante.
- ✓ Après 30 minutes d'incubation à une température ambiante, l'absorbance du mélange est lue à 430 nm.
- ✓ Préparation de la solution de quercétine 0.01% pour la courbe d'étalonnage

6.3 Activité antioxydante :

L'activité antioxydante de l'extrait de laurier ainsi que celle de vitamine C a été évaluée par la méthode de **Brand-Williamset al., 1995**.

Le DPPH est un radical libre stable violet en solution, il présente une absorbance caractéristique dans un intervalle compris entre 512 et 517nm. Cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit en diphénylpicryl hydrazine par un composé approprié radicalaire, entraînant ainsi une décoloration .L'intensité de la couleur est proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (**Sanchez-Moreno, 2002**).

La réaction peut être résumée sous forme de l'équation de DPPH :



Où: (AH) représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH (violet) pour le transformer en diphénylpicryl hydrazine (jaune) (Brand-William et al, 1995).

➤ **Mode opératoire :**

- ✓ Préparer une solution de DPPH stock à 24mg/100ml de méthanol.
- ✓ Préparer une solution DPPH* : 10ml de la solution stock + 100ml de méthanol ; l'absorbance de cette solution doit être comprise entre 1.1 et 1.2.
- ✓ Préparation de la gamme de concentration variant de l'acide ascorbique de 10 à 90 µg/ml de méthanol et d'extrait de 10 à 60 µg/ml (**Figure13**).
- ✓ Chaque essai est réalisé en triple essai, à l'abri de la lumière. Dans chaque tube à hémolyse, introduire dans l'ordre:
 - 150µl de chaque essai (solution fille).
 - 150µl de méthanol.
 - 2850µl ml de solution de DPPH*.
- ✓ Un contrôle est effectué en introduisant 150 µl de méthanol avec 2850 µl de DPPH*.
- ✓ Incubation pendant 1h à température ambiante et à l'abri de la lumière.
- ✓ La lecture des absorbances se fait au spectrophotomètre à 517 nm.

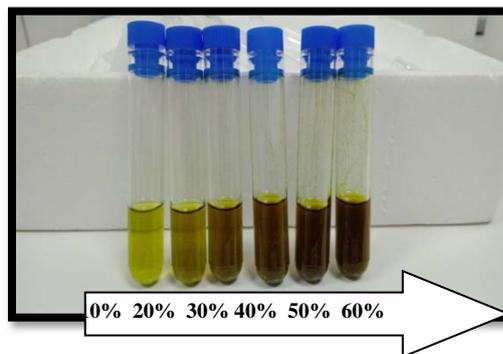


Figure 13. Dilutions de l'extrait de *Laurus nobilis* L.

➤ **Expression des résultats :**

L'activité anti radicalaire est exprimée en pourcentage d'inhibition selon l'équation suivante:

$$\% \text{ d'inhibition} = (\text{Abs control} - \text{Abs essai} / \text{Abs control}) * 100$$

La CI_{50} est calculée à partir de la courbe donnant l'activité anti radicalaire en % d'inhibition en fonction de la concentration en $\mu\text{g/ml}$.

7. Effet antimicrobien de *Laurus nobilis* L. :

7.1 Revivification et repiquage des souches microbiennes :

La revivification de la souche est une étape nécessaire avant son utilisation car son activité biologique est nulle à l'état conservé. Cette revivification a pour objectif l'obtention d'une culture jeune et pure.

➤ Mode opératoire :

- ✓ Repiquage de la souche de référence conservée dans un milieu de gélose nutritive sur milieu Muller Hinton (MH) favorable à sa croissance (**Guiraud, 2003 ; Annexe 04**)
- ✓ En premier lieu, la souche de référence est sortie du réfrigérateur et laissée sur la paillasse de 30 à 60 minutes, pour revenir à la température ambiante.
- ✓ 1ml du milieu de conservation contenant la bactérie est prélevé et mis dans 10 ml de bouillon nutritif.
- ✓ Incuber à 37°C pendant 3 heures.
- ✓ 0,1ml de cette dernière solution a étéensemencé en surface d'une boîte de Pétri contenant le milieu MH.
- ✓ Incubation du mélange de la boîte à 37°C pendant 24 heures.

➤ Préparation de l'inoculum :

Dans 5 ml d'eau physiologique, nous avons prélevé quelques colonies similaires et bien isolées. Après homogénéisation de la suspension bactérienne à l'aide d'un vortex, la densité est mesurée par spectrophotomètre réglé à une longueur d'onde de 650 nm. La densité optique obtenue doit être comprise entre 0,08 et 0,1 ce qui correspond à une concentration de 10^6 à 10^8 UFC/ml (**Rasooli et al., 2006 ; Figure14**).

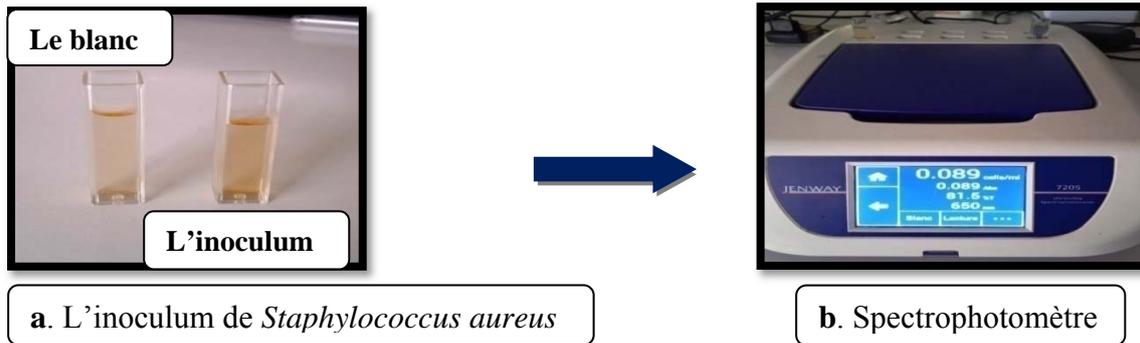


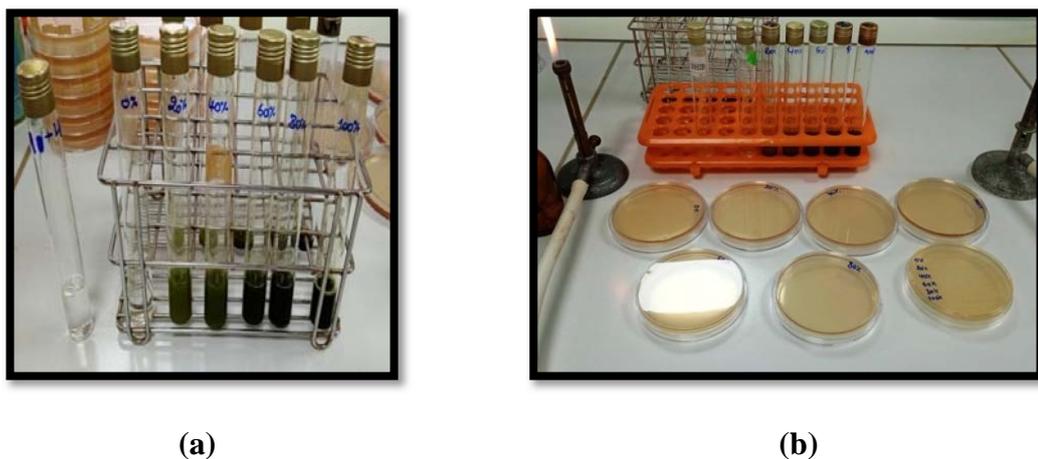
Figure 14. Mesure de la densité optique de l'inoculum.

➤ Préparation des dilutions décimales de la bactérie *Staphylococcus aureus* :

A partir de l'inoculum bactérien, des dilutions décimales isotopiques croissantes dans l'eau physiologique ont été effectuées allant jusqu'à 10^{-5} .

8. Méthode de contact direct :

- ✓ Ajout à chaque concentration d'extrait (0%, 20%, 40%, 60%, 80%, 100%) préalablement préparée, de 1 ml de la dilution décimale 10^{-4} de *Staphylococcus aureus*, avec agitation (Figure 15).
- ✓ Ensemencement de 0.1ml en triple essais de chaque concentration en surface, sur milieu MH. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24h (Bourgeois et Leveau, 1980 ; Annexe 05).



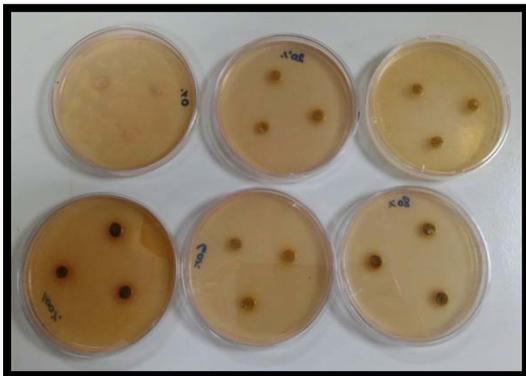
(a) Solutions d'extrait ensemencées de *Staphylococcus aureus* ; (b). Ensemencement de l'inoculum en surface de la gélose MH.

Figure 15. Méthode de contact direct.

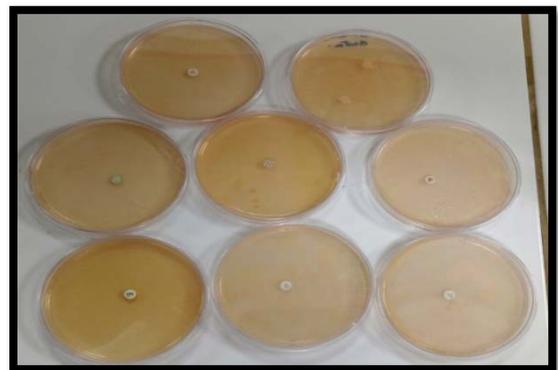
9. Aromatogramme :

La méthode des disques est une méthode décrite par **Vincent (1991)**. Le principe de l'aromatogramme est inspiré de l'antibiogramme. Elle consiste à tester la sensibilité des souches bactériennes par la diffusion de l'extrait sur un milieu solide dans une boîte de Pétri (**Annexe 06**):

- 100 µl de la suspension microbienne dont la turbidité a été ajustée à 10^8 UFC/ml pour la bactérie étudiée ont été ensemencés uniformément sur toute la surface de plusieurs boîtes de Petrie coulées au milieu MH solide.
- Après séchage en surface (environ 30 min), 03 disques stériles de papier Whatman de 3 mm de diamètre imbibés pendant 5 minutes dans chaque concentration d'extrait hydroéthanolique de *Laurus nobilis* L. (contenant environ 15 µl de chaque solution d'extrait) ont été déposés à l'aide d'une pince stérile à la surface de chaque boîte de Pétri contenant le milieu gélosé MH ensemencé au germe *S. aureus* (**Braga et al., 2007 ; Figure 16**).
- De plus, plusieurs disques d'antibiotiques AMX 25, CAZ30, AMC30, NAL30, CHL30, BCT30, CHI ,CN, VAN ont été ensuite déposés en triplet successivement à la surface de chaque boîte de pétri renfermant le milieu MH ensemencé au germe étudié.
- Les boîtes de Pétri ont été laissées couvercle fermé à température ambiante pendant 30 minutes avant d'être incubées à 37°C pendant 24h.



a . Boîtes de Pétri gélosées ensemencées au *S. aureus* et de différents disques d'extrait



b. Boîtes de pétri gélosées, ensemencées au *S. aureus* et de différents disques d'antibiotique

Figure 16. Préparation des disques d'aromatogramme.

L'activité antibactérienne de l'extrait de laurier est déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition formée autour de chaque disque. Les diamètres des zones d'inhibition sont ensuite mesurés en millimètre (**Tableau 05**).

Tableau 05. Transcription des diamètres d'inhibition des disques imprégnés (**Moreira et al. , 2005**).

Diamètres de la zone d'inhibition (mm)	Transcription	Sensibilité du germe
<8	–	Résistant
9-14	+	Sensible
15-19	++	Très sensible
>20	+++	Extrêmement sensible

10. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) :

La CMI est définie comme étant la plus faible concentration antibiotique et/ou en principes composés actifs nécessaires pour inhiber la croissance d'un microorganisme (**Denis et al, 2011**).

Dans le cas de notre étude, c'est la concentration la plus faible de l'extrait

hydroéthanolique de *Laurus nobilis* L. capable d'inhiber la croissance du germe «*Staphylococcus aureus*».

Pour la détermination de la CMI, une colonie jeune du germe étudié a été prélevée à l'aide d'une anse à platine puis, inoculée dans 10 ml de bouillon MH et incubée pendant 03 heures à 37°C en vue d'obtenir un inoculum. une prise de 0,2 ml de l'inoculum a été introduite respectivement dans 2 ml de chaque extrait dilué non pas avec de l'eau mais avec le bouillon Mueller Hinton (**Annexe 07**).

Les tubes contenant le mélange extrait préparé à différentes concentrations (0, 20, 40, 60, 80 et 100%) et inoculum d'une bactérie pathogène ont été ensuite incubés à 37 °C pendant 24 heures, comme décrit dans le protocole de **Moroh et al, 2008**.

La détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI à été effectuée à partir de la mesure de la turbidité induite par la croissance du microorganisme étudié. La CMI

correspond donc à la plus petite concentration pour laquelle il y a absence de turbidité. Par conséquent, c'est le premier tube où la valeur d_i sera égale à d_f ($d_f = d_i$).

Le taux de survie du microorganisme est mesuré au spectrophotomètre réglé à 560 nm comme suit :

$$S = (d_f - d_i / D_f - D_i) \times 100$$

Avec :

- ✓ S : Taux de survie du microorganisme en %.
- ✓ $d_f - d_i$: Différence de densité optique dans la solution phénolique ensemencée avant et après incubation à 37°C durant 18 heures.
- ✓ $D_f - D_i$: Différence de densité optique dans la solution sans extrait de laurier avant et après incubation à 37°C durant 18 heures (**Kra et al., 2001 ; Zrihi et al., 2007**).

11. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) :

La concentration minimale bactéricide d'une espèce de germe étudié représente la plus petite concentration d'extrait de la plante qui laisse 0,01% de survivants de l'inoculum initial après incubation (**Moroh et al., 2008**).

Pour sa détermination, le tube témoin (inoculum) a été dilué à l'eau physiologique jusqu'à 10^{-4} , ce qui représente 0,01% de survie du microorganisme testé. Elle est ensemencée par strie sur une Gélose Mueller Hinton puis incubée à 37°C pendant 24h (**Annexe 08**).

Le nombre de colonies de bactéries obtenu sur la strie de la dilution 10^{-4} a été comparé à celui de chaque tube expérimental contenant l'inoculum bactérien, également ensemencé sur le même milieu de culture en strie et incubé à 37 °C durant 24 heures. Ainsi, le premier tube expérimental dont le nombre de colonies présent sur sa strie est inférieur ou égal à celui de la dilution 10^{-4} correspond à la CMB.

12. Traitement statistique :

Les résultats ont subi une analyse de la variance mono factorielle en randomisation et une comparaison des moyennes deux à deux selon le test de NEWMAN et KEULS. Les données ont été traitées par le logiciel STAT BOX 6.4. L'effet du facteur étudié a été démontré aux deux seuils de probabilités : à $p < 0.05$ et à $p < 0.01$.

Partie III

Résultats et discussion

1. Résultats :

1. 1. Polyphénols totaux :

Les résultats du dosage des composés phénoliques totaux de l'extrait hydroéthanolique et de la matière brute végétale des feuilles de *Laurus nobilis* L., sont représentés dans le (Tableau 06 ; Annexe 09).

Tableau 06. Dosage des composés phénoliques dans l'extrait hydroéthanolique et la matière végétale brute des feuilles de laurier.

Extrait hydroéthanolique des Feuilles de <i>Laurus nobilis</i> L., (mg EAG/ml)	Feuilles de <i>Laurus nobilis</i> L., (mg EAG/100g MS)
25.33 ± 00.4	4219.45 ± 66.20

EAG : Equivalent Acide Gallique ; MS : matière sèche.

L'extrait hydroéthanolique de *Laurus nobilis* L. a accusé une teneur en polyphénols de 25.33 mg EAG/ml d'extrait.

Par ailleurs, les feuilles de laurier ont présenté une quantité de composés phénoliques d'environ 4219.45 mg EAG/100g MS, en moyenne.

1.2. Flavonoïdes :

Les variations des taux en flavonoïdes totaux dans l'extrait hydroéthanolique et dans la matière brute végétale des feuilles de *Laurus nobilis* L., sont illustrées dans le (Tableau 07 ; Annexe 10).

Tableau 07. Evaluation de la teneur en flavonoïdes dans l'extrait hydroéthanolique et les feuilles de *Laurus nobilis* L.

Extrait hydroéthanolique des feuilles de <i>Laurus nobilis</i> L., (mg EQ/ml d'extrait)	Feuilles de <i>Laurus nobilis</i> L., (mg EQ/100g MS)
13.01 ± 00.20	1800.21 ± 00.30

EQ : équivalent quercétine ; MS : matière sèche.

La teneur en flavonoïdes totaux a été évaluée à 13.01mg EQ par ml d'extrait hydroéthanolique des feuilles de *Laurus nobilis* L.

Par contre, les concentrations dans les feuilles de la plante ont été estimées à 1800.21 mg EQ par 100g de matière sèche.

1.3. Activité antioxydante :

L'extrait de laurier noble présente un taux d'inhibition de 85.78 ± 0.02 %. Le paramètre IC 50 est défini comme étant la concentration de l'extrait efficace pour réduire 50 % de DPPH en solution. L'IC 50 de l'extrait a été de l'ordre de 23.00 µg/ E vit C / ml bien inférieur à celle de la vitamine C standard ayant marqué une valeur de 77.36 µg E vit C/ml. L'extrait de *Laurus nobilis* L. a été démontré posséder un pouvoir scavenger de 49.79 µg E Vit C/ml (**Tableau 08 ; Annexe 11**).

Tableau 08. Evaluation de l'activité antioxydante de l'extrait hydroéthanolique de *Laurus nobilis* L.

Pouvoir Scavenger (µg E Vit C/ml d'extrait)	Taux d'inhibition (%)	Extrait hydroéthanolique EC50 µg/ml	Acide ascorbique EC 50 µg E vit C/ml
49.79 ± 00.10	85.78 ± 0.2	23.00 ± 01.70	77.36 ± 0.3

E Vit C : Equivalent vitamine C, IC50 : Concentration inhibitrice à 50%

1. 4. Test de croissance de germe pathogène *Staphylococcus aureus* :

L'effet de l'extrait hydroéthanolique à différentes concentrations sur la croissance du germe *Staphylococcus aureus* responsables de toxi-infection alimentaires est mentionné dans la (**Figure 17** et le **Tableau 09**).

Comparativement à la concentration témoin à l'eau, la croissance de *Staphylococcus aureus* a été totalement inhibée à 20% d'extrait éthanolique aqueux de *Laurus nobilis* L. ($P < 0,01$). Aucune croissance n'a été constatée à 20 % d'extrait de laurier riche en principaux composés phénoliques.

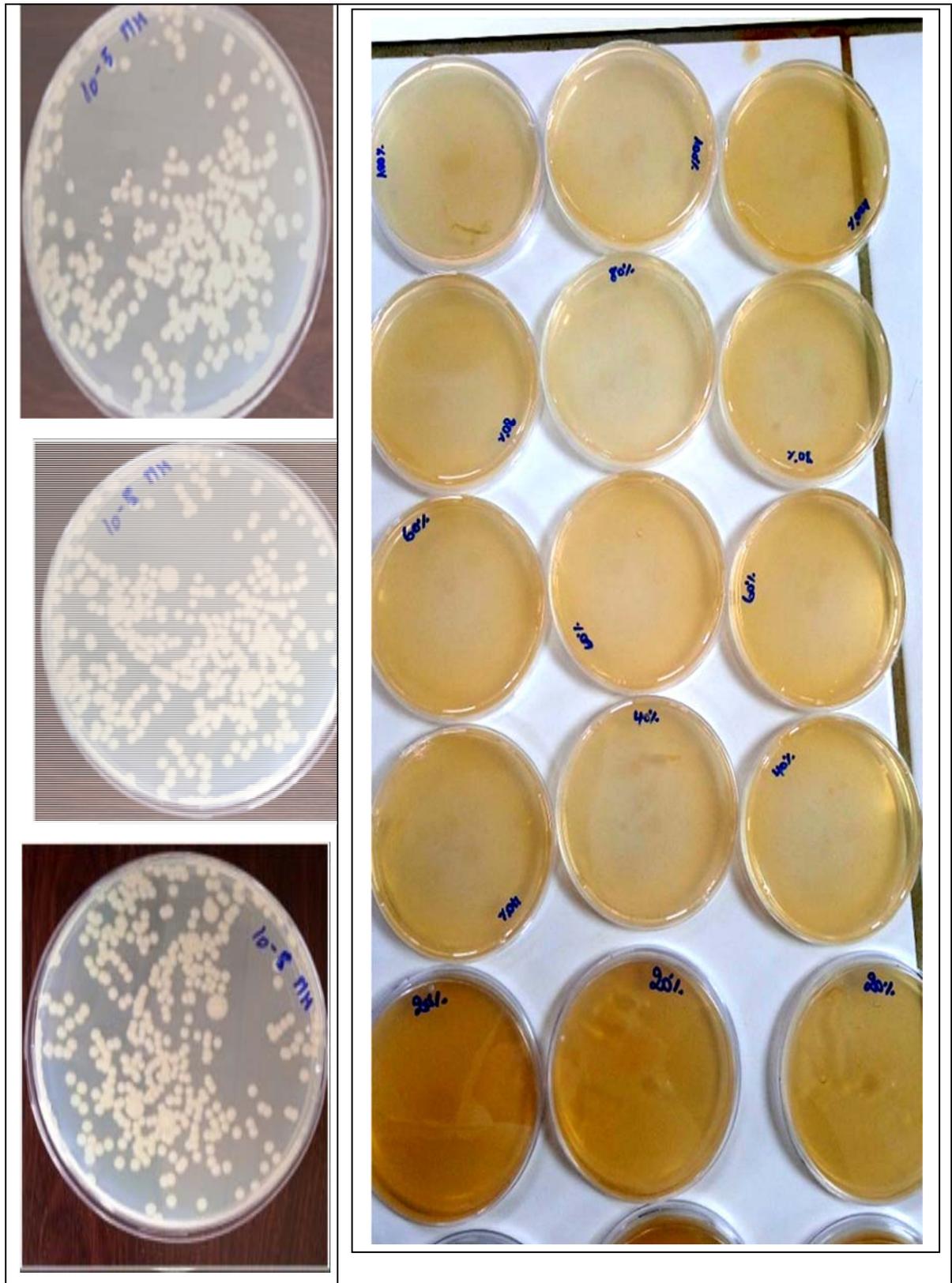


Figure 17. Effet des concentrations de l'extrait hydroéthanolique de *Laurus nobilis* L. sur la croissance de *Staphylococcus aureus*.

Tableau 09. Effet des concentrations de l'extrait hydroéthanolique de *Laurus nobilis* L. sur la croissance de *Staphylococcus aureus*.

Mesures	Concentration de l'extrait hydroéthanolique de <i>Laurus nobilis</i> L						Effet de l'extrait
	0% (Témoin)	20%	40%	60%	80%	100%	
Germes (UFC/ml)	80. 10 ⁵ (a)	00 (b)	00 (b)	00 (b)	00 (b)	00 (b)	p<0.01
Taux de croissance (%)	100 (a)	00 (b)	00 (b)	00 (b)	00 (b)	00 (b)	p<0.01

Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes avec un nombre de répétition n égale à 03 (n=3) ;p ≤0.01effet hautement significatif du facteur étudié (concentration en extrait de *Laurus nobilis* L); a,b,..d ; comparaison des moyennes deux à deux selon le test de NEWMAN et KEULS.

1.5. Diamètres d'inhibitions:

Les résultats consignés dans le (Tableau 10 et la Figure 18) ont montré que le *Staphylococcus aureus* est extrêmement sensible a la gentamicine, avec un diamètre de la zone d'inhibition le plus élevé soit 25.00 mm et un taux d'inhibition référentiel de 100%. L'extrait a eu une bonne activité inhibitrice aux différentes concentrations testées sur la souche bactérienne, avec un diamètre d'inhibition remarquable de 18.67mm à la concentration absolue de 100% et un taux d'inhibition de 74.67 % relativement proche (p<0.01) de la gentamicine.

.

Une faible sensibilité de *Staphylococcus aureus* a été observée vis-à-vis de certains antibiotiques dont AMX, AV, BCT avec des diamètres d'inhibition respectifs de 12, 14 et 17mm. En revanche, l'extrait pur de laurier concentré à 100% a présenté comparativement à ces antibiotiques des taux d'inhibition et donc une efficacité antibactérienne bien plus élevée (p<0.1), de 155.56 %, 133.33 % et 105.64 % respectivement.

Par ailleurs, le taux d'inhibition de cet extrait a avoisiné 93.33 et 91.06%, par apport à la CHL et NAL , respectivement.

Néanmoins, il a été observé une résistance de *Staphylococcus aureus* aux antibiotiques CAZ 30, CN, AMC3, avec des diamètres d'inhibition de 00mm (Figure 18).

Tableau 10. Effet de l'extrait hydroéthanolique de *Laurus nobilis* L. sur les variations des diamètres et des taux d'inhibition chez *Staphylococcus aureus*.

Types d'antibiotiques Témoin	Mesures	Concentration de l'extrait de <i>Laurus nobilis</i> L.						Effet de l'extrait
		0% Témoin	20%	40%	60%	80%	100%	
GENT	Diamètre d'inhibition (mm)	25.00 ± 08.66 (a)	10.67 ± 01.53 (b)	13.33 ± 01.53 (b)	14.67 ± 01.53 (b)	16.33 ± 1.53 (b)	18.67 ± 00.58 (ab)	p<0.01
	Taux d'inhibition %	100 (a)	42.67 (a)	53.33 (d)	58.67 (cd)	65.33 (c)	74.67 (b)	
BCT	Diamètre d'inhibition (mm)	17.67 ± 04.04 (a)	10.67 ± 1.53 (b)	13.33 ± 1.53 (ab)	14.67 ± 1.53 (ab)	16.33 ± 1.53 (a)	18.67 ± 0.58 (a)	p<0.01
	Taux d'inhibition %	100 (a)	60.37 (d)	75.46 (c)	83.00 (b c)	92.43 (ab)	105.64 (a)	
NAL	Diamètre d'inhibition (mm)	20.50 ± 0.5 (a)	10.67 ± 1.53 (d)	13.33 ± 1.53 (c)	14.67 ± 1.53 (bc)	16.33 ± 1.53 (b)	18.67 ± 0.58 (a)	p<0.01
	Taux d'inhibition %	100 (a)	52.03 (d)	65.04 (c)	71.54 (b c)	79.67 (b)	91.06 (a)	
AV	Diamètre d'inhibition (mm)	14.00 ± 00 (b)	10.67 ± 1.53 (c)	13.33 ± 1.53 (b)	14.67 ± 1.53 (b)	16.33 ± 1.53 (b)	18.67 ± 0.58 (a)	p<0.01
	Taux d'inhibition %	100 (b)	76.19 (c)	95.24 (b)	104.76 (b)	116.67 (b)	133.33 (a)	
AMX	Diamètre d'inhibition (mm)	12 ± 00 (cd)	10.67 ± 1.53 (d)	13.33 ± 1.53 (cd)	14.67 ± 1.53 (bc)	16.33 ± 1.53 (b)	18.67 ± 0.58 (a)	p<0.01
	Taux d'inhibition %	100 (cd)	88.89 (d)	111.11 (cd)	122.22 (bc)	136.11 (b)	155.56 (a)	
CHL	Diamètre d'inhibition (mm)	20.00 ± 00 (a)	10.67 ± 1.53 (d)	13.33 ± 1.53 (c)	14.67 ± 1.53 (bc)	16.33 ± 1.53 (b)	18.67 ± 0.58 (a)	p<0.01
	Taux d'inhibition %	100 (a)	53.33 (d)	66.67 (c)	73.33 (bc)	81.67 (b)	93.33 (a)	

Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes avec un nombre de répétition n égale à 03 (n=3) ; p ≤0.01 effet hautement significatif du facteur étudié (concentration en extrait de *Laurus nobilis* L) ; a,b,c ...d ; comparaison des moyennes deux à deux selon le test de NEWMAN et KEULS.

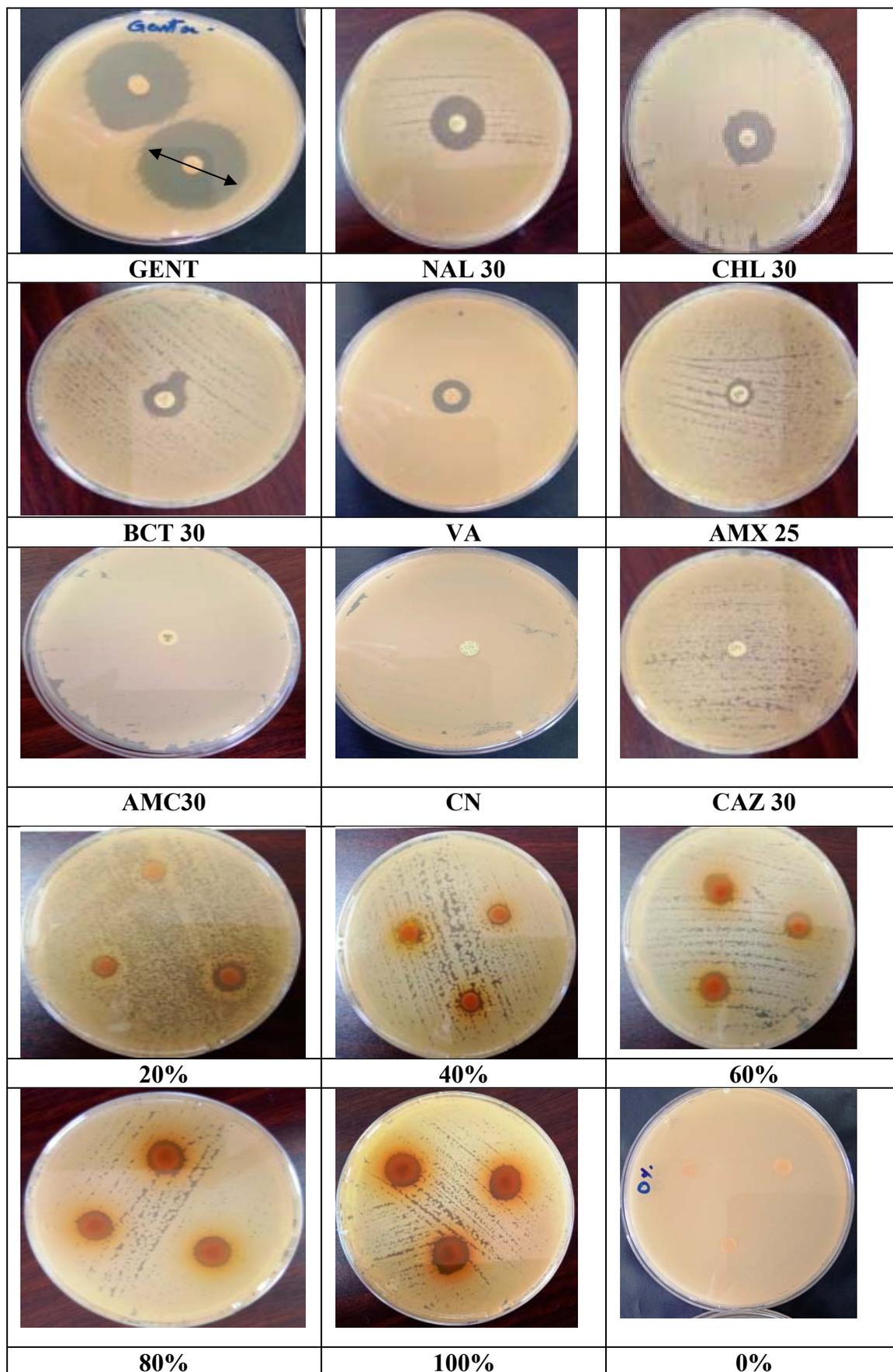


Figure 18. Diamètres d'inhibition de *Staphylococcus aureus* par les différents antibiotiques et les concentrations de l'extrait de *Laurus nobilis*

6. Concentration minimale inhibitrice (CMI) :

Il a été observé une diminution progressive de l'intensité du trouble induit par la croissance des bactéries au fur et à mesure que la concentration de l'extrait végétal augmentait dans les tubes expérimentaux (**Tableau 11**).

Tableau 11 .Evaluation de la CMI de l'extrait hydroéthanolique de *Laurus nobilis* L.

Germe	Paramètres	Concentration de l'extrait hydroéthanolique de <i>Laurus nobilis</i>					
		0% (Témoin)	20%	40%	60%	80%	100%
<i>Staphylococcus aureus</i>	D_i	0.210	0.88	0.47	0.81	1.05	1.25
	D_f	0.939	0.10	0.25	0.39	0.64	0.65
	D_f - D_i	0.73	00	00	00	00	00
	S (%)	100	00	00	00	00	00
CMI=20%							

D_i : densité optique avant incubation **D_f** : Densité optique après incubation **S** : Taux de survie du Micro organisme en%

La concentration minimale inhibitrice de l'extrait hydroéthanolique de *Laurus nobilis* L. est obtenue à partir de 20% ; la CMI correspond à 5.07 mg EAG/ ml d'extrait hydroéthanolique de *Laurus nobilis* L.

7. Concentration minimale bactérienne (CMB) :

Les différentes solutions expérimentales de *Laurus nobilis* L. contaminées par *Staphylococcus aureus* présentent une absence total de germe a partir de 20 jusqu'à 100% d'extrait. L'absence de développement microbien à 20% d'extrait indique le nombre de colonies nulle bien inférieur au nombre de colonies de *Staphylococcus aureus* développés par l'inoculum de la bactérie ensemencé à une dilution de 10⁻⁴. Donc la CMB vis-à-vis du germe *Staphylococcus aureus* a été obtenue à 20% d'extrait hydroéthanolique des feuilles de laurier, correspondant à 5.07 mg EAG/ ml d'extrait (**Figure 19**).

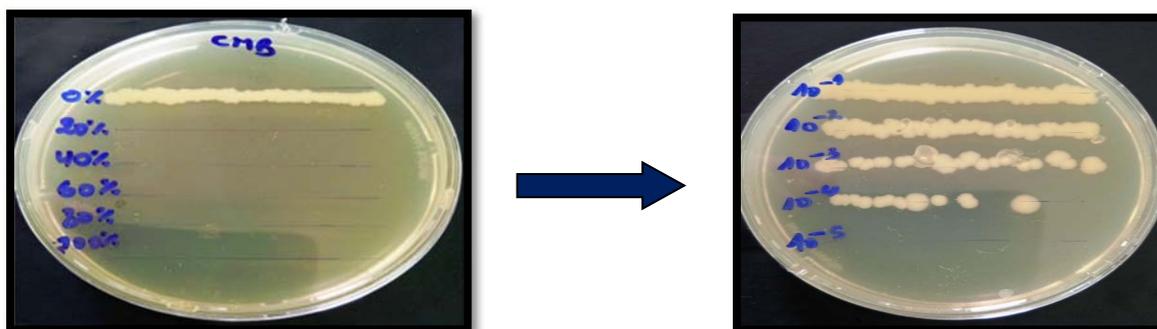


Figure 19. Evaluation de la CMB de l'extrait hydroéthanolique de *Laurus nobilis* L. chez les *Staphylococcus aureus*.

8. Rapport CMB/CMI :

Le rapport d'activité CMB/CMI d'une substance antimicrobienne lorsqu'il est inférieur à 4 selon **Marmonier, 1990** elle peut être qualifiée de substance bactéricide. Donc l'extrait hydroéthanolique de *Laurus nobilis* L., semble exercer un effet de type bactéricide envers la souche étudiée (**Tableau 12**).

Tableau 12. Effet antibactérien de l'extrait hydroéthanolique de *Laurus nobilis* L chez *Staphylococcus aureus*.

Souche	CMI	CMB	CMB/CMI	Activité	Normes
<i>Staphylococcus aureus</i>	20%	20%	01	Bactéricide	CMB/CMI \geq 04 ✓ effet bactériostatique CMB/CMI \leq 04 ✓ effet bactéricide (Marmonier, 1990)

2. Discussion :

Cette étude nous a permis de réaliser l'extraction de l'extrait hydroéthanolique des feuilles de *Laurus nobilis* L. et d'évaluer d'une part les principes composés bioactifs et le pouvoir antioxydant le constituant, et en d'autre part, de suivre son activité antibactérienne sur la croissance de la souche pathogène *Staphylococcus aureus*.

Le taux des composés phénoliques totaux évalués dans l'extrait hydroéthanolique des feuilles de *Laures nobilis* L., récolté dans la région Tizhi Ghenif de la wilaya de Tizi Ouzou est supérieur à celui trouvé par **(Guerdouh, 2017)** dans la station forestière de la commune d'Oudjana- Jijel ; 0.26 mg EAG par ml d'extrait des feuilles de *Laurus nobilis*. Cependant, nos résultats sont inférieurs à ceux de **(Aichaoui et al. , 2020)** qui ont rapporté des teneurs variables, de 129 à 170 mg EAG /ml d' extrait hydroéthanolique des feuilles de laurier dans la foret de Handla, relevant de la wilaya de Tipaza. Ces différences peuvent être dues à la faible spécificité du réactif de Folin Ciocalteu qui est extrêmement sensible à la réduction de tous les groupes hydroxyles non seulement des composés phénoliques ; mais également de certains sucres et protéines **(Gomez Caravaca et al. , 2006)**. Ces réponses peuvent être également liées à la diversité dans les différents procédés d'extraction, des solvants utilisés ainsi que des paramètres d'extraction tels que la température et le temps d'extraction **(Popovici et al., 2009)**.

La teneur en flavonoïdes totaux de l'extrait de la plante estimée à 13.01mg EQ/ml d'EX est beaucoup plus élevée que celle avancée par **(Guerdouh , 2017)** ($0.76 \pm 2,14$ mg EQ/ml d'extrait) et **Kaurinovic et Vastag ,2019)** (5.02 ± 0.007 mg EAG/ml d'extrait). Nos résultats rapportés à la matière végétale ont montré des valeurs (180 mg EQ/ g MS) relativement plus élevées à ceux de **(Dhifi et al. , 2018)** qui ont trouvé une quantité remarquable de 149.2 mg / g MS.

L'évaluation de l'activité antioxydante réalisée par la méthode de réduction de radical DPPH a montré que l'extrait peut agir en tant que bon piègeur des radicaux libres, avec une IC50 de 23.00 µg E Vit C/ml et un pouvoir Scavenger de 49.79 µg E vit C/ml d'extrait. Son effet antioxydant s'est avéré meilleur que celui de l'acide ascorbique (témoin) qui a présenté une IC50 de 77.36 ± 0.3 µg E vit C/ml. Des résultats similaires ont

été rapportés par **(Bendjerzi , 2017)** .Ayant remarqué des valeurs d' IC50 de 28,13 µg/ml d'extrait des feuilles de laurier.

Le test de sensibilité de *Staphylococcus aureus* montre la présence d'une activité antibactérienne aux différentes concentrations d'extrait avec un diamètre d'inhibition allant de 10.67 à 18.67 mm.

Selon l'échelle donnée par **Moreira et al. (2005)**, la bactérie *Staphylococcus aureus* est très sensible (++) à l'extrait hydroéthanolique des feuilles de la plante étudiée, mais semble moins sensible (+) aux antibiotiques CAZ 30, CN et AMC3.

Plusieurs travaux ont mis en évidence la grande sensibilité des bactéries Gram + par rapport aux Gram – vis-à-vis des extraits des plantes. Ceci peut être attribué à la différence entre les couches externes des bactéries Gram (-) et Gram (+) **(Georgantelis et al., 2007)**. L'hypersensibilité de la souche étudiée peut être expliquée probablement par sa grande sensibilité. Etant une bactérie Gram (+) aux changements environnementaux externes, tels la température et l'action des composés phénoliques hydrophiles vis à-vis de extraits la membrane externe de la bactérie **(Balentine et al., 2006)**.

L'analyse des données expérimentales d'évaluation de la concentration minimale inhibitrice montre bien que comparativement au témoin, il y a une diminution du trouble provoqué par la croissance du germe étudié dans les tubes expérimentaux au fur et à mesure que la concentration en extrait augmente. En effet, la CMI et la CMB ont été relevées à 20% d'extrait hydroéthanolique de la plante et contenant une teneur en composés phénoliques de l'ordre de 5.07 mg EAG/ml.

L'activité d'une substance végétale dépend de plusieurs facteurs dont le mode d'extraction et la concentration en principes actifs **(Wagner, 1993 ; Thangara et al., 2000)** . A ce propos, il est bien établi que le laurier sauce contient de nombreux composés bioactifs dont les flavonoïdes, les sesquiterpènes, les acides phénoliques , les anthocyanes et les alcaloïdes **(Ouchikh et al., 2011)**.

Par ailleurs, d'après le rapport CMB/CMI inférieur à quatre il ressort que l'extrait hydroéthanolique de *Laurus nobilis* L. a un pouvoir de type bactéricide vis-à-vis de la souche référence étudiée à savoir *Staphylococcus aureus* (ATCC 33862).

D'une manière générale, l'action antibactérienne des extraits de la plante riche en principaux composés bioactifs tels les composés phénoliques sur la bactérie étudiée peut s'expliquer par une attaque de la paroi bactérienne, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires, suivie d'une acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure avec une destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie (**Deferera et al, 2003**).

Ces travaux montrent clairement que l'utilisation de l'extrait hydroéthanolique de *Laurus nobilis* L., dans le domaine alimentaire pour lutter contre le germe *Staphylococcus aureus* responsable de TIAC est justifiée par son efficacité antibactérienne remarquable qui s'avère très élevée comparativement à de nombreux antibiotiques dont CAZ 30, CN ,AMX 25 et AMC30.

Conclusion

Conclusion :

Les plantes médicinales sont la source première des principes actifs naturels utilisés pour leurs propriétés biologiques diverses, tant sur le plan traditionnel qu'industriel.

Dans cette logique, nous avons visé dans ce travail deux aspects principaux de l'activité du laurier sauce, de son nom scientifique *Laurus nobilis* L. et avons obtenu des résultats prometteurs quant à son utilisation en tant que conservateur naturel de substitution en industrie agroalimentaire.

Sur le plan phytochimique, l'évaluation du pouvoir antioxydant de l'extrait a été réalisée par une quantification des polyphénols et flavonoïdes totaux, suivie de méthodes spectrophotométriques utilisant le DPPH*. Les résultats obtenus démontent un fort pouvoir scavenger de l'extrait hydroéthanolique du laurier, avec un taux d'inhibition élevé, dépassant même celui de l'acide ascorbique, utilisé comme témoin.

L'activité antibactérienne des composés phénoliques contenus dans l'extrait hydroéthanolique du laurier sauce a été testée vis-à-vis de l'un des principaux germes pathogènes responsables de toxi-infections alimentaires, à savoir, le *Staphylococcus aureus*, par la méthode de contact direct et diffusion sur gélose.

L'extrait a engendré chez cette bactérienne faible croissance microbienne et des diamètres d'inhibitions proches de la Gentamicine.

La concentration minimale inhibitrice(CMI) contre ce germe a été relevée à 20% d'extrait. La concentration minimale bactéricide (CMB) a également été relevée à 20% d'extrait. Ceci révèle que l'effet antimicrobien de l'extrait est de type bactéricide contre le *Staphylococcus aureus*.

En perspective, il serait souhaitable de mener une étude plus approfondie afin d'isoler et de caractériser la nature des principaux composés actifs responsables des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes constatées dans l'extrait hydroéthanolique du *Laurus nobilis* L. et de le tester sur d'autres germes pathogènes responsables de toxi-infections alimentaires.

Références bibliographiques

Références bibliographiques :

A

- **Adesegun S. A., Fajana .A., Orabueze .C. I., Coker H- A- B. 2007.** Evaluation of antioxidant properties of *Phaulopsis fascisepala* C B Cl (Acanthaceae). Evidence based complementary and alternative medicine.6 (2) : 227-231.
- **Ayoola .G. A., Ipav .S. S., Solidiya .M. O., Adepoju-Bello A-A., Coker .H- A-B., Odugbemi T. O. 2008.** Phytochemical screening and free radical scavenging activities of the fruits and leaves of *Allanblackia floribunda* Oliv (Guttiferae). International journal of health research.1(2) : 81-93.
- **Ananthanarayan P., Paniker S.2006.** Textbook of Microbiology. Edition Seventh, India.p 665.
- **Anses .2011.** *Staphylococcus aureus* et entérotoxines staphylococciques Famille des Staphylococcaceae. Genre *Staphylococcus* Bactérie. Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments 2011 *Staphylococcus aureus* et entérotoxines staphylococciques.
- **Aichaoui S.2020.** Étude Théorique De L'effet Des Extraits De *Laurus Nobilis* L. Sur L'activité Anti-inflammatoire In Vitro Et In Vivo 2020.
- **Al-Kalaldeh J.Z., Abu-Dahab R., Afifi F.U.2010.** Nutr. Res., 30:4, 271-278.

B

- **Bouza, A.2009.** Les Toxi-infections Alimentaires Collectives dans l'Est Algérien. Alimentation, Nutrition et Santé, Sciences Alimentaires et Nutrition : Institut De La Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agroalimentaires (INATAA). Constantine, p 66.
- **Balentine C.W., Crandall, P.G., OBryan C.A., Duong D.Q., Pohlman F.W.2006** The pre and post-grinding application of rosemary and its effects on lipid oxidation and color during storage of ground beef. Meat Science. 73: 413-421.
- **Bukharie H.A., Abdelhadi M.S., Saeed I.A. 2001.** Emergence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* as a community pathogen. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001 ; 40 : 14.

- **Benhamou D., Carrié A.S., Lecomte F.2005.** Staphylococcus aureus ;role and impact in treatment of nosocomial pneumonia. Rev Mal Respoir. 22 : 595-603.
- **Bouyahya J., Abrini A., Et-Touys F., Lagrouh N., Dakka R., Bakri Y. 2018.** Analyse phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante des échantillons du miel marocain Phytochemical Analysis and Evaluation of the Antioxidant Activity of Moroccan Honey Samples. Phytothérapie 16:S220–S224.
- **Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset .C.1995.** Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm.Wiss, Technol. 28: 25-30.
- **Buelga I., Ferreira I.C.F.R., 2014.** Food Chemistry 156 :339–346.
- **Barla A., Topçu G., Öksüz S., Tümen G., Kingston D.G.I., 2007.** Identification of cytotoxic sesquiterpènes from Laurus nobilis L., Food chemistry 104 : 1487-1484.
- **Bernard C.2021.** Le laurier noble, ou laurier sauce (Laurus nobilis) <https://www.altheaprovence.com/le-laurier-noble-ou-laurier-sauce-laurus-nobilis>.
- **Bendjersi F.Z. 2017.** Etude de la composition chimique des extraits de *Laurus nobilis* L. Spécialité : chimie organique appliquée USTHB : 05/2017. p 8.

e

- **Cadby P., Ellis G., Hall B., Surotd C., Veye M. 2011.** Flavour and fragrance. J. 26 : 2-6.
- **Cisero M., Appendino G., Tagliapietra S., Mario Nano G. 1992.** Phytochemistry, 31:7,p 2537-2538.
- **Couture B. 1990.** Bactériologie médicale «Etude et méthodes d'identification des bactéries aérobies et facultatives d'intérêt médical». Vigot, Paris.p 15-32.
- **Cheminat A., Stampf J.L., Benezra C.1984.** Arch. Dermatol. Res., 276:3, p178-181.

D

- **Denis F., poly M.C., Martin C., Bingen E., Quentin R. 2007.** Bacteriologies médicale: techniques usuelles. Edition Elsevier Masson. p 27-251.

- **Di Giannatale E., Vincenza P., Alfreda T., Cristina M., Giacomo M. 2011.**Characterisation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food for human consumption. *Veterinria Italiana*, 47(2), p165-173.
- **Deferera D.J., Ziogas B.N and Polissiou, M.G .2003.** The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerera*, *Fusarium* sp and *clavibacter michiganensis* subsp.michiganensis *Crop Protection*, 22, p39-44.
- **Demir V., Guhan T., Yagcioglu A.K., Ddegirmencioglu A.2004.** Mathematical modeling and the Determination of some Quality Paramaters of Air-dried Bay leaves. *Biosystems Engineering*. 88 (3) : 325-335.
- **Dias M.I., Barros L., DueõsM., Alves R.C., Oliveira M.B.P.B., Santos C.2005.** Castilho, M. do Céu Costa, A. Rodrigues, and A. Partidário. C. *JAOCS*, 82:12, 863-868.p28.

E

- **Ertas M., Alma M. H. (2010).** *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, 88. 22-29.

F

- **Freny J., Kloos W., Hajek V., Webster J., Bes M., Brun Y., Vernozy Rozand C. 1999.** Recommended minimal standers for description of new *Staphylococcal* species . *International Journal of Systematic Bacteriology* 49, 489-502.
- **Ferreira A., Proença C., Serralheiro M.L.M., Araújo M.E.M. 2006.** The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *J. Ethnopharmacology*. 108: 31-37.
- **Fiorini C., Daid B., Fourastet I., Vercauteren J.1998.** Acylated kaempferol glycosides from *laurus nobilis* leaves. *phytochemistry*, Vol.41, n°5, p 821-824.
- **Fang F., Shengmin S., Kuang Y.C., Alexander G., Chi-Tang H., Robert T.R.2005.** Isolation and identification of cytotoxic compounds from Bay leaf (*Laurus nobilis*). *Food Chemistry*, Vol. 93, p 497–501.

G

- **Guerdouh R. ,2017 Université Med-Seddik benyahia.** Propriétés physico-chimiques et antifongiques des extraits de deux espèces médicinales : Laurier noble (*Laurus nobilis* L) et laurier rose (*Nerium oleander* L). p 40-41.

- **Gotfried G., 2021.** Intoxication alimentaire à staphylocoque. Le Manuel MSD pour les professionnels, MD Lewis Katz School of Medicine at Temple University
- **Gómez-Caravaca AM, Gómez-Romero M, Arráez-Román D, Segura Carretero A, and Fernández-Gutiérrez A.2006.** Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Vol. 41, p 1220- 1234.
- **Georgantelis, D., Ambrosiadis, I., Katikou, P., Blekas, G., Georgakis, S A.2007.** Effect of rosemary extract, chitosan and α -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4 °C. Meat Science. 76: 172-181.
- **Gajdács, M. 2020.** Taxonomy and nomenclature of bacteria with clinical and scientific importance: current concepts for pharmacists and pharmaceutical scientists. Acta pharmaceutica Hungarica. 89. 99-108.
- **Guiraud J.P., Rosec J.P., 2004.** Pratique des normes en microbiologie alimentaire. Edition AFNOR, Paris. pp 168-178.
- **Geerts P., Rammeloo J., Van Cauteren G.,2002.** *Laurus nobilis* : le livre du laurier. Gand: Ed. Ludion; 2002. 131.
- **Golmakani M. T., Rezaei K. 2008.** Food Chemistry, 109, 925-930.

7

- **Ito T, Okuma K, Max X.,2001.** Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome : genomic island SCC. *Drug Resist Updat* 2003 ; 6 : 41-52.
- **Iserin. P. 2001** .Larousse des plantes médicinales identification préparation et soins,paul encyclopédia of medicinal plants 2nd édition1996.2001, Ed andrew chevalier ,2007. ISBN 978-2-03-582308-3. p 225-226.

8

- **Kivçak B., Mert T.2002.** Preliminary evaluation of cytotoxic properties of *Laurus nobilis* leaf extracts. *Fitoterapia*. 73: 242-243
- **Kra, A.K.M. 2001.** Evaluation et amélioration par séquençage chromatographique d'une action antifongique de misca contre *Aspergillus fumigatus*. Thèse de doctorat 3ème cycle UFR Biosciences.Univ.Abidjan.pp: 126.

- **Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I. 2001.** Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* ; 357 : 1225-40.

L

- **Longo L., Vasapollo G. 2005.** Journal of Agricultural Food Chemistry, 53, 8063-8067.

M

- **Marakov V.A. 1971.** Khimiya Prirodnikh Soedimenii, 7 :2, 203.
- **Moroh, J.L.A., C. Bahi, K. Dje, Loukou Y.G. and. Guede-guina F. 2008.** Study of the antibacterial activity of *Morinda morindoides* (Baker) Milne-Redhead (Rubiaceae) acetate extract (ACE) on in-vitro growth of *Escherichia coli* strains. Bulletin Societe Royale des Sciences Liege, 77: 44-61.
- **Muñiz-Márquez D.B., Martínez-Ávila G. C., Wong-Paz J. E., Belmares-Cerda R., Rodríguez-Herrera R., Aguilar C. 2013.** Ultrasonic Sonochemistry, 20, 1149-1154. 24 G.
- **Marmonier A.A. 1990.** Introduction aux techniques d'étude des antibiotiques. In Bactériologie médicale, Techniques Usuelles. Doin, Paris, France : 227-236.
- **Muanda F., 2010 .** Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. Biologie végétale. Université Paul Verlaine - Metz, 2010. Français. ffNNT : 2010METZ011Sff. fftel-01752680f
- **Merino N., Toledo-Arana A., Vergara-Irigaray M., Valle J., Lasa I. 2009.** Protein Mediated multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*. J.Bacteriol. 191, 832-843.

O

- **Ouibrahim A., Tlili-Ait Y. Kaki, Bennadja S., Mansouri R., Ait Kaki S., Samiha Khbizi, Djebar M.R. 1. 2016.** Activité antioxydante et anti-candidosique de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* L. provenant de la région d'El Kala (Nord-Est Algérien). Algerian Journal of Natural Products (Online ISSN: 2353-0391). Algerian Journal of Natural Products 3:3 (2015) 209-20016.

- **Ouchikh O., Chahed T., Ksouri R., Ben Taarit M., Faleh H., Abdelly C., Kchouk M. E., Marzouk B.2011.** Journal of Food Composition and Analysis, 24:1, 103-110.
- **Oliveira D.C., Tomasz A., Lencastre H.2002.** Secrets of success of a human pathogen : molecular evolution of pandemic clones of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet Infect Dis* 2002 ; 2 : 180-9.

P

- **Popovici C, Saykova I, Tylkowski B.2009.** Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. Revue de génie industriel, Vol.4, p 25-39.
- **Prescott, L.M., J.P. Harley and D.A. Klein .2003.** Microbiologie. De Boeck-Supérieur.p 1137.

Q

- **Quezel, P., Santa, S.1962.**Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales .Ed. Centre National de la Recherche Scientifique. Tome I.p 565

S

- **Skerget M., Kotnik P., Hadolin M., Rizner Hras A., Simoni M., Knez Z. 2005.**Food Chemistry, 89, 191-198.
- **Sanchez-Moreno C. 2002.** Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Int. J. of FoodsSci. Tech.* 8: 121-137.
- **Simic M., Kundakovic T., Kovacevic N.2003.** Preliminary assay on the antioxidative activity of *Laurus nobilis* extracts. *Fitoterapia*, Vol 4, p613–616.
- **Sultana B.,Anwar F.,Ashraf M.,2009.**Effet of extraction solvant /technique on the ontyoxidant activity of selected medicinal plant extract.*Molecules*14 :2167-2180.
- **Sato, A., Yamaguchi, T., Hamada, M., Ono, D., Sonoda, S., Oshiro, T., Nagashima, M., Kato, K., Okazumi, S., Katoh, R., Ishii, Y., Tateda, K.2019.** Morphological and Biological Characteristics of *Staphylococcus aureus* Biofilm Formed in the Presence of Plasma. *Microbial drugesistance* (Larchmont, N.Y.), 25(5), 668–676.

- **Shamma M., Guinaudeau H.1984**, Natural Product Reports, 201-207.
- **Sayyah M., Valizadeh J., Kamalinejad M. 2002**. Anticonvulsant activity of the leaf essential oil of *Laurus nobilis* against pentylenetetrazole. *Phytomedicine*. 9 : 212-216.
- **Shanson, D. C. 1981**. Antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Hosp. Infect.* 2:11-36.

7

- **Teuscher E., Anton R., Lobstein A.2005**.Plantes aromatiques: épices, aromates, condiments et leurs huiles essentielles. Paris: Ed. Tec&Doc; 2005. pp. 285-289.
- **Thangara J. H. S., Adjei O., Allen B. W., and Portaels F.2000**. In-vitro activity of ciprofloxacin, sparfloxacin, ofloxacin, amikacin and rifampicin against Ghanian isolatesof *Mycobacterium ulcerans*. *Journal Antimicrobial Agents Chemoter*, 45 (2), 231-233.
- **Touaitia, R.2016**.*Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline : Emergence et mécanismes de résistance. Thèse de doctorat : Microbiologie. Annaba : Université Badji Mokhtar Annaba, 125p.
- **Tanaka R., Sakano y., Shimizu K., Shibuya M., Ebizuka Y., Goda Y., 2006**. *Journal of Natural Medicine*.60, p 78-81.
- **Topçu G. , Tümen G. , Kiliç T., Gören A. C. , Barla A. , Türkmen Z. , Kingston D. G. I. 2009**. *Innovation in Chemical biology*, 6, 61-81.
- **Ton-That, H., H. Labischinski, B. Berger-Bachi, and O. Schneewind. 1998**. Anchor structure of staphylococcal surface proteins. III. Role of the FemA, FemB, and FemX factors in anchoring surface proteins to the bacterial cell wall. *J Biol Chem* 273:29143-29149.

20

- **Wagner H.1993**. *Pharmazeutische Biologie. Drogen und irhe inhaltsstaffe*, Gustav Fisher Verlag. Sturtgart-New-York. p 50.

21

- **Yakhlef, S. Laroui, L. Hambaba, M.C. Aberkane, A. Ayachi.2011**. *Phytothérapie*, 9:209-218.

- **Yoshikawa M., Shimoda H., Uemura T., Morikawa T., Kawahara Y., Matsuda H. 2000.** Bioorganique and Medicinal Chemistry, 8:8, 2071-2077.



- **Zrihi G.N., Kra A.K.M., Etien D.T.2007.** Étude botanique et évaluation des activités antifongiques de *Mitracarpus villosus* (MV) (Rubiaceae) et *Spermacoce verticillata* (SV) (Rubiaceae) sur la croissance in vitro de *Aspergillus fumigatus*. Revue Méd. Pharm. Afr.20: 9-17.
- **Zhang H. F., Yang X. H., Wang Y.2011.** Trends in Food Science and Technology, 22, 672-688. 13Ferhat M. A., Meklati B. Y., Smadja J., Chemat F. (2006). J. of Chromatography A, 1112, 121-126.
- <https://www.anses.fr/fr/system/files/MIC2011sa0117Fi.pdf>
- <https://www.bioser.com/productos/baird-parker-agar-medio-base-80p/>
- <https://microbiologiemedicale.fr/gelose-au-sang/>
- <https://www.aquaportail.com/definition-10543-staphylocoque.html>
- **Anonyme 01 :**
<https://www.monaconatureencyclopedia.com/laurusnobilis/?lang=fr>. Consulté le: 04/04/2020.
- **Anonyme 02** (www.aromatherapie-huiles-essentielles.com).
- **Anonyme 03 :**
<https://www.gov.mb.ca/health/publichealth/diseases/staphylococcal.fr.html>

Annexe 01. Les milieux de culture

➤ Muller Hinton agar :

Infusion de viande de bœuf.....	300g
Hydrolysate de caséine.....	17,5g
Amidon de maïs.....	1,5g
Agar-agar	17,0g
Eau distillée	1000 ml

pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C : 7,3 ± 0,2.

➤ Bouillon Muller Hinton :

Extrait de viande	2g
Hydrolysate acide de caséine	17,5g
Amidon soluble	1,5g
Eau distillée	1000 ml

pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C : 7,3±0,2.

➤ Bouillon nutritif :

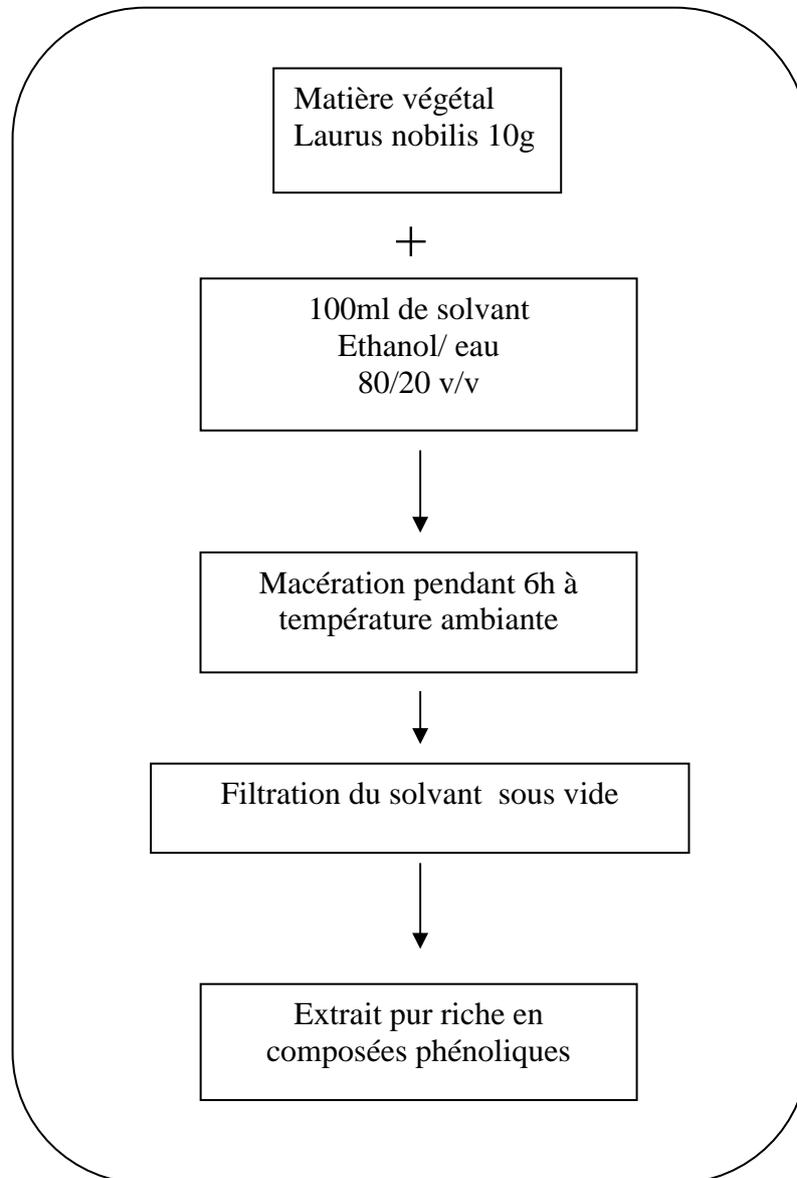
Peptone.....	10 g
Extrait de bœuf	1 g
Extrait de levure.....	2g
Chlorure de sodium	5g
Eau distillée	1000ml

pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C : 6.8 ±0,2.

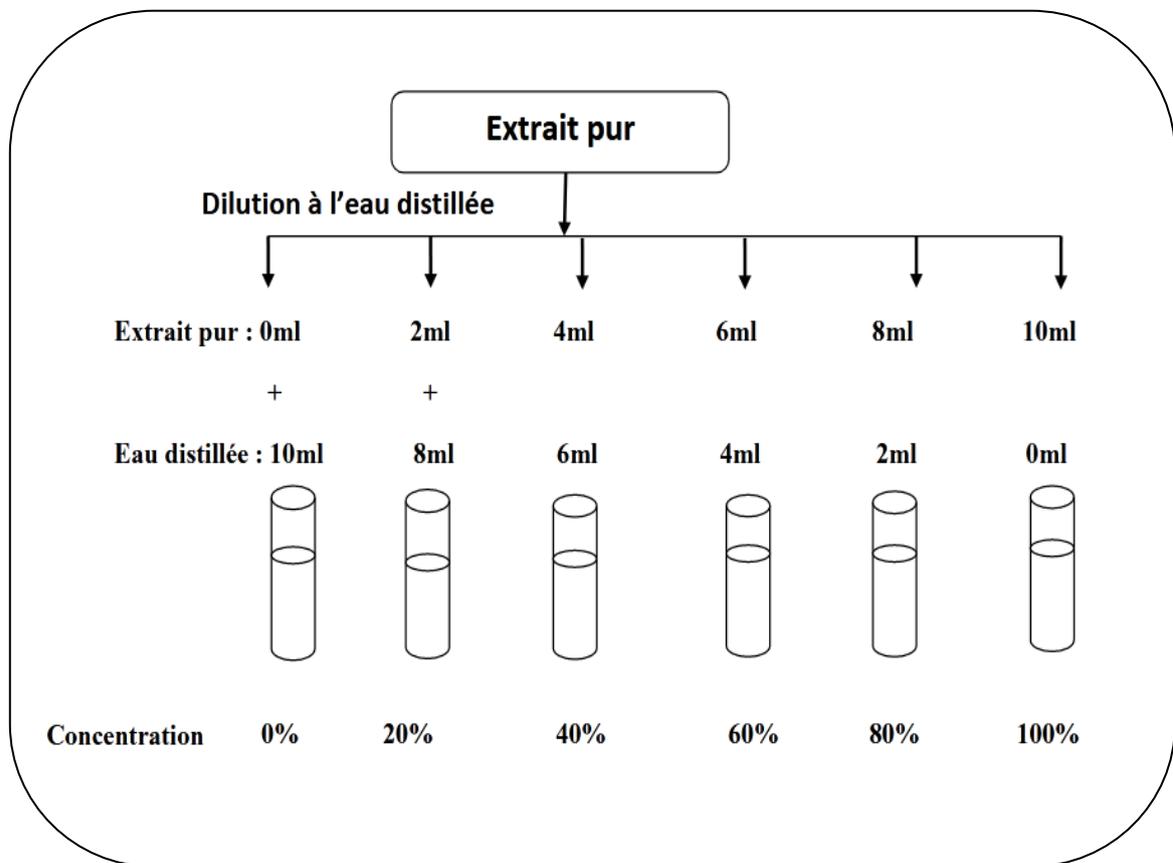
➤ Eau physiologique :

Chlorure de sodium	9g
Eau distillée	1000g

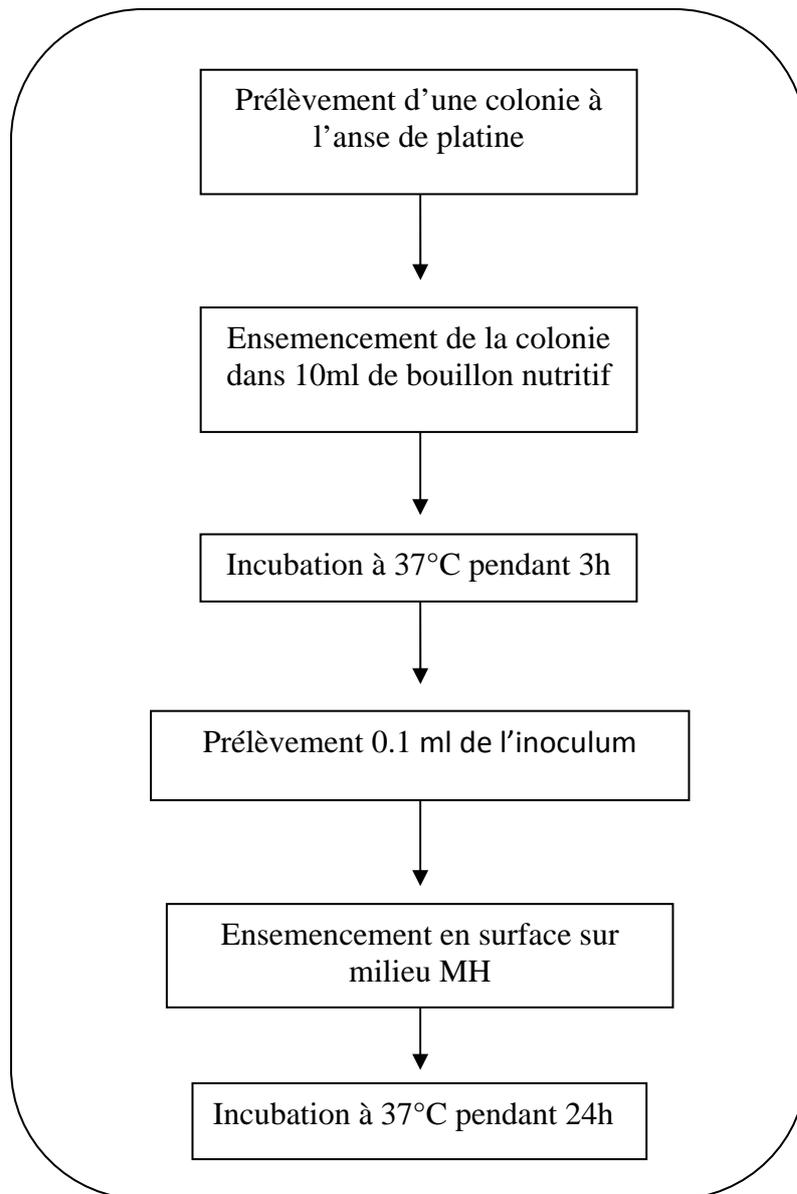
Annexe 02. Diagramme d'extraction des composés phénoliques de l'extrait
(Sultana et al., 2009)



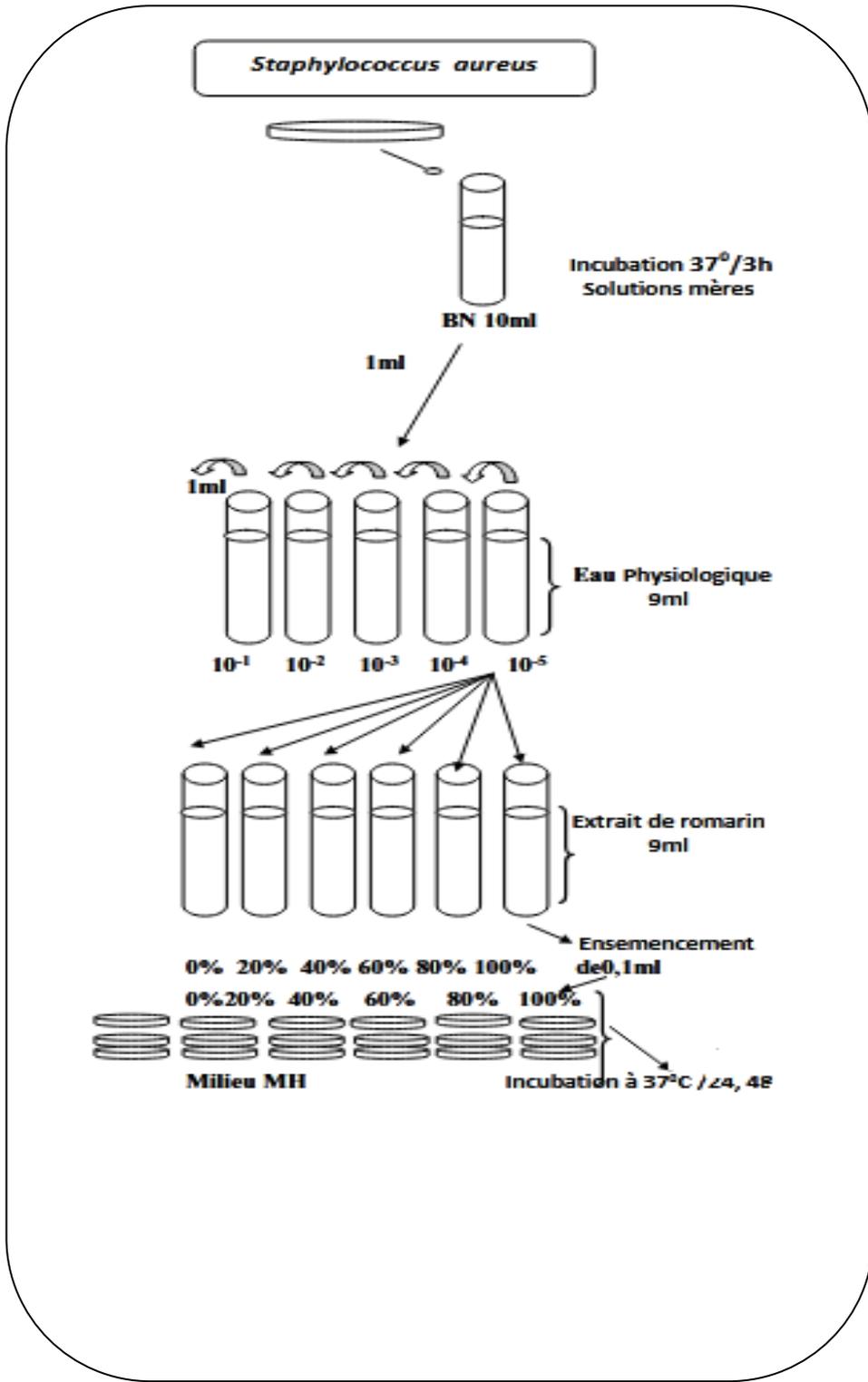
Annexe 03. Méthode de préparation des différentes solutions expérimentales de l'extrait.



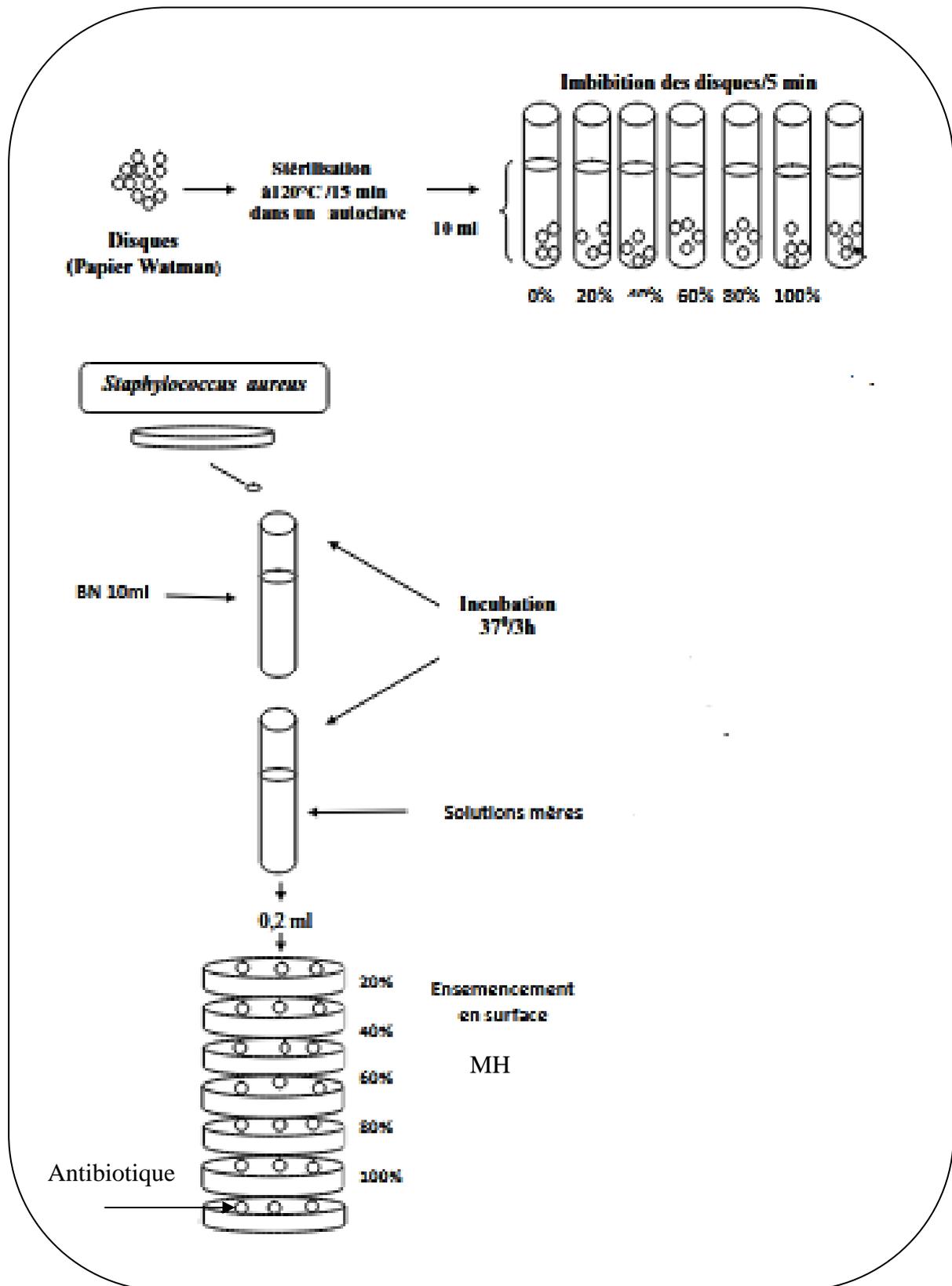
Annexe 04.Diagramme d'activation de *Staphylococcus aureus*



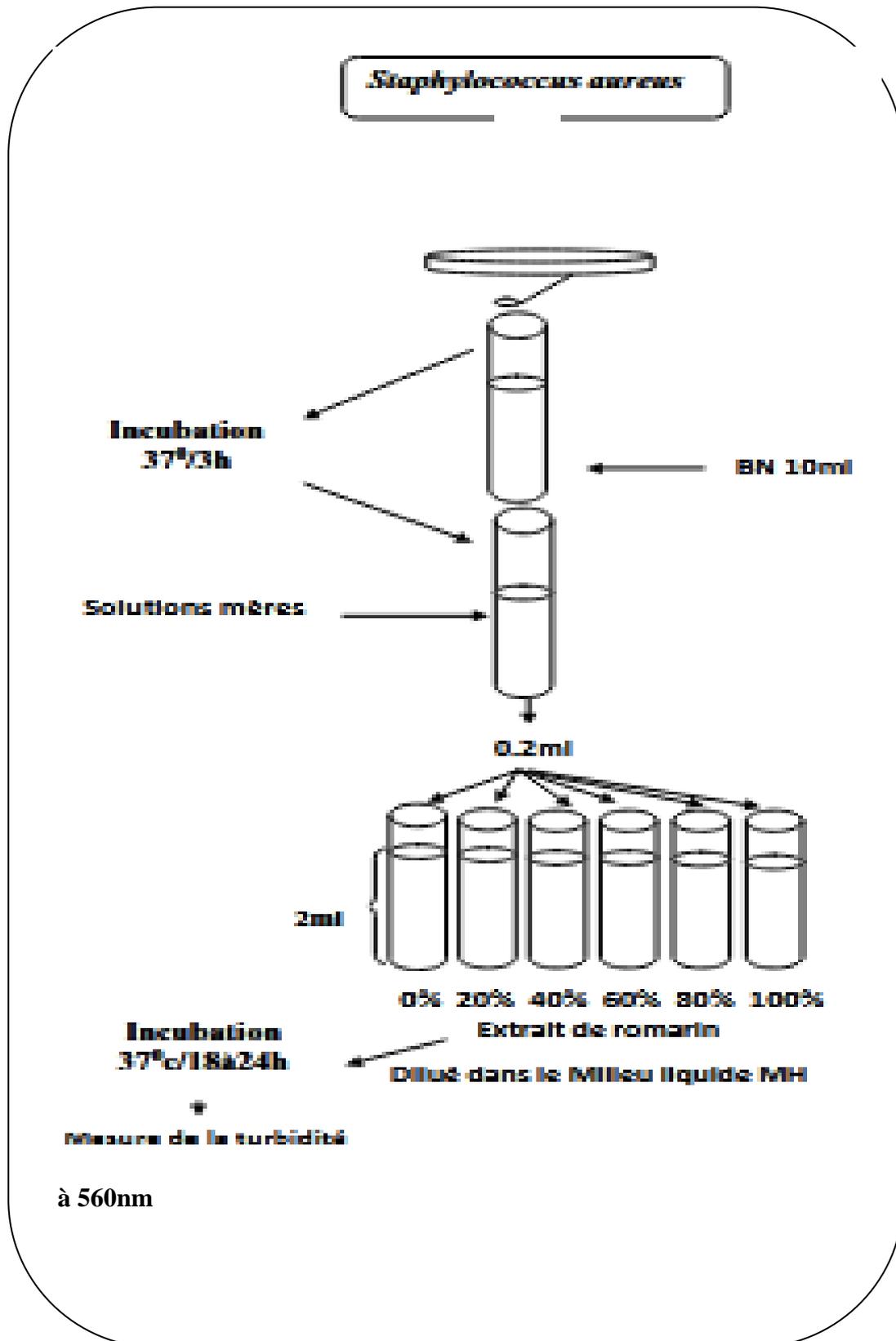
Annexe05.Méthode de contact direct



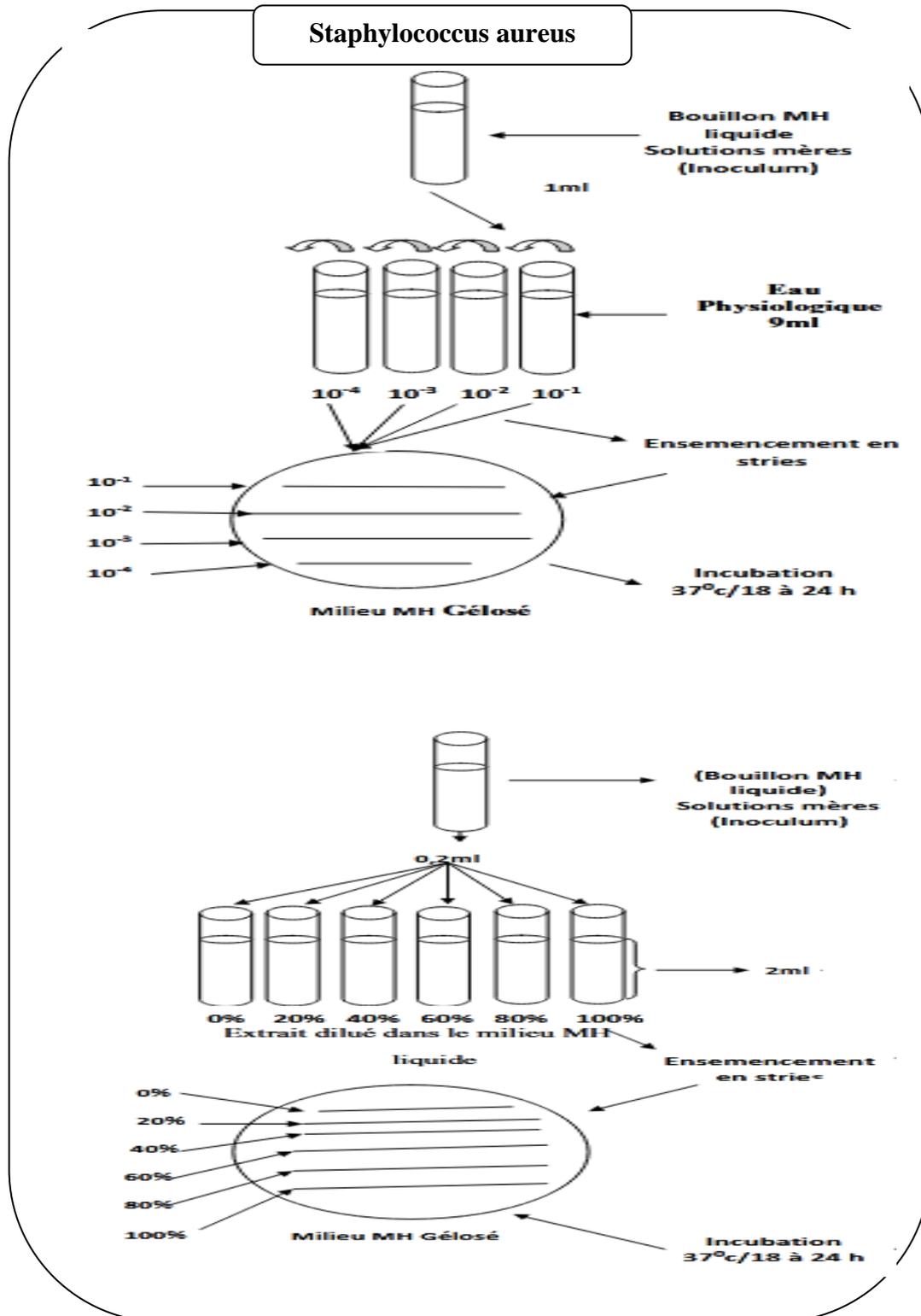
Annexe 06.Méthode des disques par diffusion sur gélose (Prescott et al, 2003)



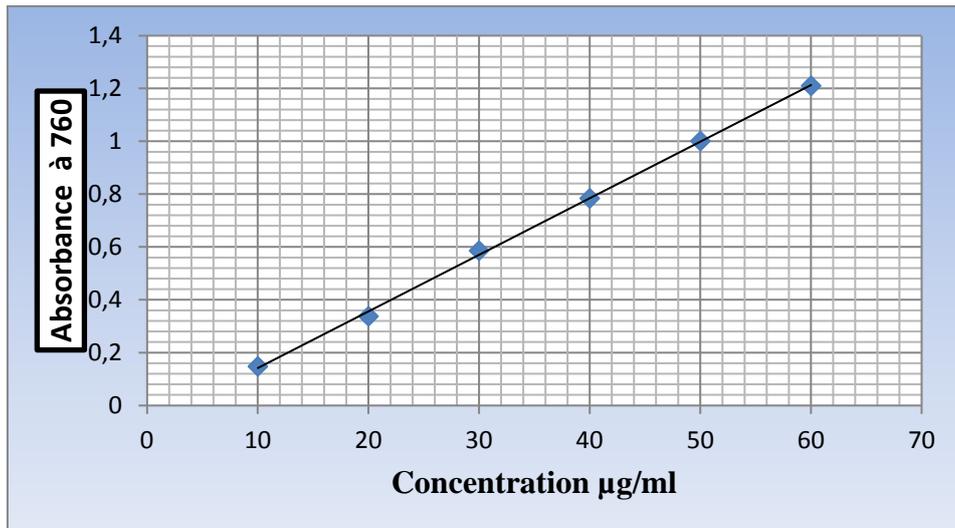
Annexe 07.Méthode de détermination de la CMI



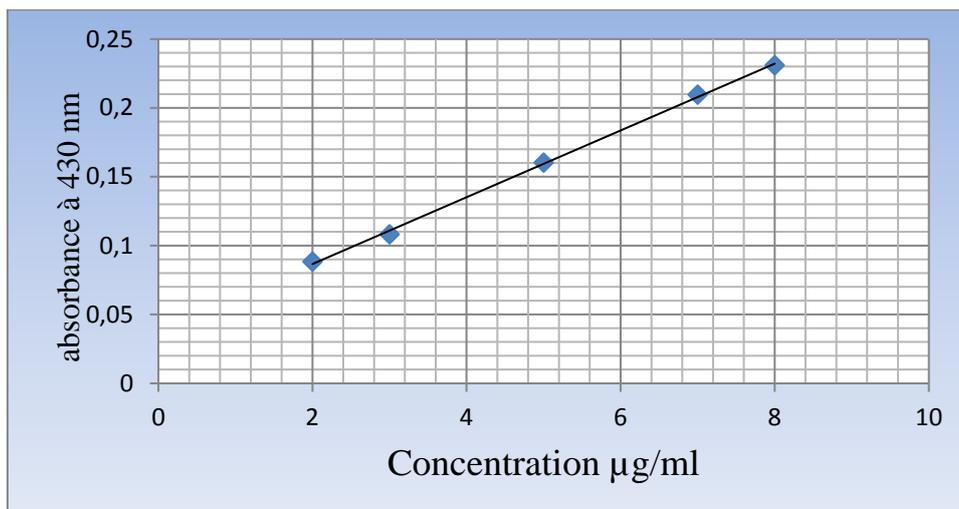
Annexe 08.Méthode de détermination de la CMB



Annexe 09. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique



Annexe 10: Courbe d'étalonnage de la quercétine



Annexe 11 .Courbes de CI50 de l'extrait de *Laurus nobilis* L.

