

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn
Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

M^{lle}. Djelti souad

M^{lle}. Belhadji hassiba

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité: BIOTECHNOLOGIE DES MICROORGANISMES

THÈME

**Etude de l'activité antioxydante et le pouvoir
antibiofilm des extraits de plante *Artemisia
herba alba* et *Thymus capitatus***

Soutenu publiquement le : / /2016

DEVANT LE JURY :

Président Mr MEKHALDI .A
Encadreur Mme REBAI .O
Co-encadreur Mlle BELKACEM .I
Examineur Mr DJIIBAOUI .R

Pr U Mostaganem
M.C.A U Mostaganem
Doctorante U Mostaganem
M.C.A U Mostaganem

DEDICACE

J'ai l'honneur de dédier ce modeste travail à :

Mes chers parents (Mohammad, Fatima)

Ma sœur (Gahida , Hanane , Fatma, Charifa , Cheima, Hamida et
Khawela).

Mes frères: Mohammad et Kadiro.

A tous mes amis :nadai, Hajar , djohar , hassiba ,samr.,

Sans oublier mes chers voisins, Saliha et Dahebai.

Et tous promotion biotechnologie des microorganismes 2016

Pour votre soutien et votre compréhension, grâce auxquels j'ai pu obtenir
le fruit de toutes ces longues années sans jamais perdre

L'espoir un seul instant, je vous dis merci mille et mille fois.

Souad



DEDICACE

*Je dédie ce travail à mes parents, qu'ils trouvent ici ma plus
profonde gratitude
et tout mon amour pour leur soutien tout au long de mes études.*

A mon frère hamouda.

A ma sœur souhila , djmia, soumia

Et toute ma famille Belhadji

À tous mes amis de l'université et d'ailleurs

Et tous promo biotechnologie des microorganismes

A tous ceux qui m'aiment

hassiba



Remerciements

Avant toute chose, nous remercions " الله " qui nous a donné la
Patience, le courage et la volonté pour réaliser ce mémoire
Pais et salut sur notre premier éducateur (محمد صلى الله عليه و سلم) le prophète pour ce qu'il a donné à
l'humanité.

Nous tiens aussi à présenter mes sincères remerciements à
Notre encadreur **Dr. Rebaï Ouafa** Pour la confiance qu'il m'a accordée en acceptant cet
encadrement.

Nous tiens aussi à remercier et notre co-encadreur **Mme Belkacem Imane** pour sa
disponibilité tout au long de l'élaboration de ce mémoire, pour ses encouragements, ses conseils,
pour son aide, ses critiques et ses suggestions, et surtout pour sa patience dans la correction de ce
travail.

Nous remercions **Dr. Djibaoui Rachid** d'avoir accepté d'honorer par sa présence, la
présidence du jury de soutenance.

Nous remercions **Dr. Mekhaldi Abdelkader** qui a bien voulu accepter d'examiner ce
modeste travail, nous l'a remercié très vivement.

Nous voudrais remercier aussi **Mr Hamoum Hakim** pour son aide, nous remercions aussi
les techniciens du laboratoire de microbiologie
Mohammad, Djillali, Radouen, Nadia et particulièrement **Hafida** pour sa patience,
son aide précieuse et ses valeureux conseils.

Finalement, nous remercions tous ceux ou celles qui ont contribué de près ou de loin à
l'accomplissement de ce mémoire.

A vous tous, un grand *Merci*

Résumé

Les extraits naturels des plantes contiennent une variété de composés phénoliques auxquels sont attribuées diverses activités biologiques. Pour cela nous avons établi à une étude expérimentale pour déterminer l'activité antioxydante, l'effet antibactérien et le pouvoir antibiofilm des extraits bruts obtenus à partir de deux plantes qui ont une grande valeur pharmaceutique, soient le *Thymus capitatus* et l'*Artemisia herba alba*. La teneur totale en composés phénoliques a été déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, elle est de (161,64 mg/ml) et (131,48 mg/ml) dans les extraits de l'*Artemisia herba alba* et *Thymus capitatus*, respectivement. Les flavonoïdes ont été évalués en utilisant la méthode de chlorure d'aluminium (AlCl₃), leur teneur est de (16,83 mg/ml) et (14,96 mg/ml) dans les extraits de l'*Artemisia herba alba* et *Thymus capitatus*, respectivement. L'extrait méthanolique de l'*Artemisia herba alba* a représenté une teneur plus élevée en polyphénols et en flavonoïdes par rapport à l'extrait méthanolique de *Thymus capitatus*. Le pouvoir antioxydant a été évalué par la technique de piégeage du radical libre (DPPH) et la réduction du fer (FRAP). Pour le premier test les valeurs d'IC₅₀ a été estimées à (2,35mg/ml) et (13,62mg/ml) pour l'extrait d'*Artemisia herba alba* et *Thymus capitatus*, respectivement. Pour le second test l'extrait *Artemisia herba alba* (1,131±0,001) a représenté l'activité la plus élevée par rapport l'extrait *T. capitatus* (0,721±0,001). L'évaluation du pouvoir antimicrobien des extraits méthanoliques par la méthode de diffusion des puits dans un milieu solide, a montré que les deux extraits possèdent un pouvoir antibactérien sur toutes les souches testées de *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*.

Mots-clés : Polyphénols, Flavonoïdes, antioxydant, biofilm, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*.

Abstract

Natural plant extract it contain a variety of phenolic compounds which are assigned various biological activities. For this we have established an experimental study to determine the antioxidant activity, the antibacterial effect and the antibiofilm potentiel of crude extracts obtained from two plants that have high pharmaceutical value, are the *Thymus capitatus* (L.) and *Artemisia herba alba* (Asso). The total content of phenolic compounds was determined using the Folin-Ciocalteu, it is (161,64mg / ml) and (131,48mg / ml) in the extracts of *Artemisia herba alba* and *Thymus capitatus*, respectively. Flavonoids have been measured using the method of aluminum chloride (AlCl₃), their content is (16,83mg / ml) and (14.96 mg / ml) in the extracts of *Artemisia alba herba* and *Thymus capitatus*, respectively. The methanolic extract of *Artemisia herba alba* shows a higher content of polyphenols and flavonoids with respect to the methanol extract of *Thymus capitatus*. The antioxidant capacity was evaluated by using technique of free radical (DPPH) and the reduction of iron (FRAP). For the first test the IC₅₀ values was estimated (2,35mg / ml) and (13,62mg / ml) for the extract of *Artemisia herba alba* and *Thymus capitatus*, respectively. The extract of *Artemisia herba alba* exhibited good antioxidant activity with a high percentage of free radical scavenging compared to *T. capitatus* extract. For the second test *Artemisia herba alba* extract (1.131 ± 0.001) represented the highest activity in comparison with the extract of *T. capitatus* (0.721 ± 0.001). Evaluation of the antimicrobial activity of the methanolic extracts by the well diffusion method in a solid medium, showed that the two extracts have antibacterial power over all tested strains of *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. The preventive effect of plant extracts and enzymes against growth and biofilm formation showed that both extracts *Artemisia herba alba* and *Thymus capitatus* have a greater effect on the inhibition of biofilm formed by the strains studied than both enzymes proteinase K and trypsin.

Key words: polyphenols, flavonoids, antioxydant, biofilm, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*.

المخلص

تحتوي النباتات الطبيعية على مجموعة متنوعة من المركبات الفينولية التي تم تعيينها في مختلف الأنشطة البيولوجية. لهذا الغرض وضعنا دراسة تجريبية لمعرفة النشاط المضاد للأكسدة، وتأثير مضادات البكتيريا ومضادات البيوفلم من المستخلصات التي تم الحصول عليها من النباتات التي لها قيمة علاجية عالية وهما الزعتر والشيح. تم قياس محتوى المركبات الفينولية باستخدام طريقة فولين، وهي من (مل/مغ 64, 161) و (مل/مغ 131,48) من مستخلصات الشيح والزعتر على التوالي. تم قياس الفلافونيدات باستعمال تقنية (AICl₃)، والنتائج كالتالي (مل/مغ 16,83) و (مل/مغ 14,96) من مستخلصات الشيح والزعتر على التوالي. يحتوي مستخلص الشيح على مادة البوليفينول والفلافونويد بنسبة عالية أكثر من مستخلص الزعتر. لدراسة قدرة مضادات الأكسدة نستعمل تقنية الجذور الحرة (DPPH) والحد من الحديد (FRAP) بالنسبة للاختبار الأول قدرت القيم IC₅₀ ب (مل/مغ 2,35) و (مل/مغ 13,62) لمستخلصات الشيح والزعتر على التوالي. مستخلص الشيح اظهر نشاط مضاد الاكسدة جيد بنسبة عالية من الجذور الحرة مقارنة مع مستخلص الزعتر. بالنسبة للاختبار الثاني قيم مستخلص الشيح (1,131±0,001) اظهر نشاط عالي مقارنة مع الزعتر. (0,721±0,001) لتقييم قوة مضاد البكتيريا نستعمل تقنية حفر الابار في وسط صلب، اظهرت النتائج نشاط قوة مضاد البكتيريا على جميع السلالات المختبرة من المكورات العنقودية الذهبية (*Staphylococcus aureus*) والعصوية الشمعية (*Bacillus cereus*). من خلال دراسة تأثير مستخلص النباتات والانزيمات على تشكيل ونمو البيو فيلم، اظهرت النتائج ان مستخلص الشيح والزعتر له تأثير كبير على تثبيط البيو فلم التي شكلته السلالات المدروسة وكذلك بالنسبة للإنزيمات المدروسة (trypsin) و (protéinase K).

الكلمات المفتاحية: البوليفينول، الفلافونويد، المضادة للأكسدة، بيوفيلم، المكورات العنقودية الذهبية، العصوية الشمعية

Tableaux de matière

Liste de tableaux

List de figure

Liste d'abréviation

[Introduction](#) 1

Chapitre I : Les plantes médicinales

1. Rappales botanique 3

2. Les plantes étudiées 3

2.1. *Thymus capitatus* 3

2.1.1. Définition 3

2.1.2. Noms vernaculaires 4

2.1.3. Position systématique 4

2.2 . *Artemisia herba-alba (Asso)* 5

2.2.1. Définition 5

2.2.2. Noms vernaculaires 5

2.2.3. Position Systématique 5

2.2.4. Composition chimique 6

2.2.5. Ecologie 6

2.2.6. Phytochimie 7

2.2.7. Utilisations de la plante en phytothérapie 7

2.2.8. Activité antimicrobienne des extraits des plantes 7

Chapitre II : Généralités sur les polyphénols

1. Généralités 9

2. Biosynthèse des polyphénols 10

2.1. Voie de l'acide shikimique 10

2.2. Voie de l'acétate / malonate 11

3. Classification des polyphénols 11

3.1. Les non flavonoïdes	11
3.1.1. Acides phénoliques (C6-C1 ou C6-C3).....	11
3.1.2. Stilbènes (C6-C2-C6)	12
3.1.3. Lignanes (C6-C3) 2	12
3.2. Les flavonoïdes C6-C3-C6.....	12
3.3. Tanins	13
4. Polyphénols dans les plantes : Localisation et intérêt	13
5. Propriétés chimiques des polyphénols	14
5.1. Polarisabilité	14
5.2. Liaison hydrogène	14
6. Stress oxydatif	15
6.1. Qu'es ce qu'un radical libre ?	15
6.2. Origines cellulaire des espèces réactives de l'oxygène.....	16
6.3. Conséquence du stress oxydatif	16
7. Antioxydants et systèmes de défense	16
7.1. Antioxydants non enzymatiques	17
7.1.1. Acide ascorbique (vitamine C)	17
7.1.2. Tocophérols (dont la vitamine E)	18
7.1.3. Caroténoïdes	18
7.2. Antioxydants de synthèse	18
8. Intérêts thérapeutiques des polyphénols	18
9. Enzymes	19
9.1. Traitements enzymatiques	19
<i>Chapitre III : Les biofilms bactériens</i>	
1. Généralités	20
2. Formation des biofilms	20
2.1. Conditionnement de la surface du milieu	21
2.2. Adhésion des bactéries	21
2.3. Croissance du biofilm	22

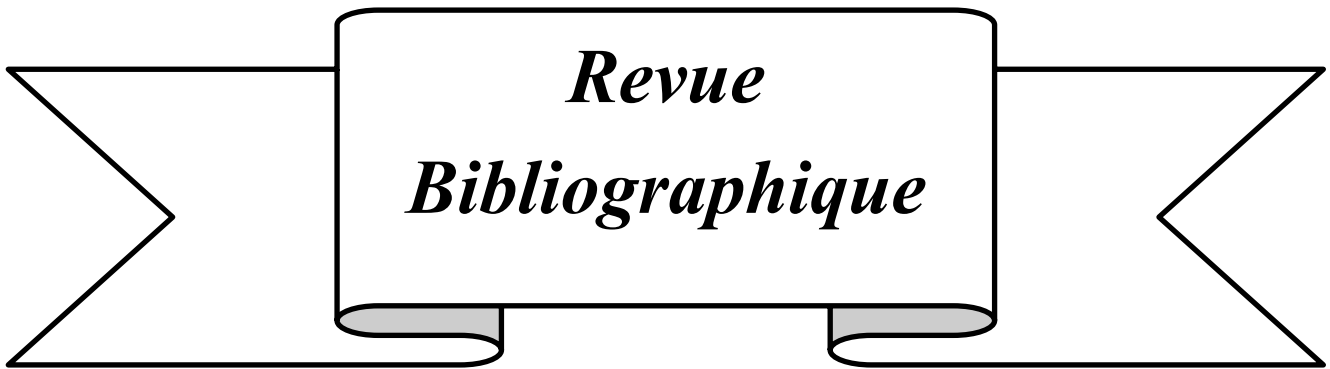
2.4. Dispersion du biofilm	22
3. Biofilm et industrie alimentaire	22
4. Caractéristiques de l'espèce d'étude <i>Bacillus cereus</i>	23
4.1. Propriétés morphologiques	23
4.2. Habitat et pouvoir pathogène	24
4.3. Description taxonomique et physiologique	24
4.3.1. Description taxonomique	24
4.3.2. Description physiologique	25
4.3.2.1. La cellule végétative	25
4.3.3. Intoxication alimentaire	27
5. <i>Staphylococcus aureus</i>	27
5.1. Historique	27
5.2. Habitat	27
5.3. Caractères bactériologiques	28
5.3.1. Morphologie	28
5.3.2. Caractères cultureux	28
5.3.3. Caractères métaboliques et physiologiques	28
6. Facteurs intervenant dans la colonisation, l'adhésion, l'invasion, la diffusion	28
6.1. La protéine de liaison au collagène	28
6.2. La protéine de liaison à la fibronectine	29
6.3. La protéine de liaison au fibrinogène (clumping factor)	29
6.4. Les sidérophores	29
6.5. La coagulase	29
7. Intoxications alimentaires de <i>Staphylococcus aureus</i>	29

Chapitre IV : Matériel et méthodes

1. Obtention des extraits de plante	31
2. Dosage des polyphénols totaux	31
2.1. Principe	31
2.2. Mode opératoire	31
3. Dosage des flavonoïdes.....	31
3.1. Principe	31
3.2. Mode opératoire	32
4. Etude de l'activité antioxydante.....	32
4.1. Méthode DPPH (2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl).....	32
4.1.2. Principe	32
4.1.3. Mode opératoire :	32
4.2. Méthode FRAP (Ferric reducing antioxidant power)	33
4.2.1. Principe :	33
4.2.2. Mode opératoire :	33
5. Méthode d'étude du pouvoir antibactérien des extraits de plante.....	33
5.1. Principe :	34
5.2. Protocole expérimental	34
5.3. Repiquage des espèces bactériennes et préparation d'inoculum	34
5.4. Préparation des solutions	34
5.5. Ensemencement	35
6. Effet des extraits d' <i>Artemesia herba alba</i> et de <i>Thymus capitatus</i> sur les biofilms matures de <i>Bacillus cereus</i> et <i>Staphylococcus aureus</i>	35
7. Effet des enzymes sur des biofilms matures de <i>Bacillus cereus</i> et <i>Staphylococcus aureus</i>	35
8. Détermination de la biomasse adhérente de <i>Bacillus cereus</i> et <i>Staphylococcus aureus</i>	36

Chapitre V : Résultats et discussion

1. Teneur des polyphénols totaux	37
2. Teneur des flavonoïdes	38
3. Evaluation de l'activité antioxydant	39
3.1. Piégeage du radical libre DPPH.....	39
3.2. Méthode de la réduction de fer (FRAP)	42
4. Activité antibactérienne des extraits de plante <i>Artemisia herba alba</i> et <i>Thymus capitatus</i>	43
5. Evaluation de l'influence des extraits de plante sur la croissance bactérienne de <i>Bacillus cereus</i> et <i>Staphylococcus aureus</i>	45
6. Evaluation de l'influence des extraits de plante sur l'adhérence de <i>Bacillus cereus</i> et <i>Staphylococcus aureus</i>	48
7. Evaluation de l'influence des enzymes sur la croissance bactérienne de <i>Bacillus cereus</i> et <i>Staphylococcus aureus</i>	50
8. Evaluation de l'effet des enzymes de l'adhérence bactérienne de <i>Bacillus cereus</i> et <i>Staphylococcus aureus</i> par la méthode cristal violet	54
Conclusion.....	58
Référence	
Annexes	



Revue
Bibliographique

Introduction

Parmi les ressources naturelles, les plantes aromatiques et médicinales occupent une large place et jouent un grand rôle dans l'économie nationale. Elles sont utilisées dans différents domaines comme l'industrie alimentaire, pharmaceutique, conserverie, et le domaine de la phytothérapie (**Duraffourd et al., 1997**). Actuellement, l'usage de la médecine traditionnelle est très répandu et revêt une importance sanitaire et économique croissante. Les plantes médicinales ont été employées pendant des siècles comme remèdes pour les maladies humaines parce qu'elles contiennent des composants de valeurs thérapeutiques. Toutefois, malgré les énormes progrès réalisés par la médecine moderne, la phytothérapie offre de multiples avantages (**Ameenah, 2006**).

Les plantes sont capables de produire une grande diversité de produits ne participant pas à leur métabolisme de base, mais représentant plutôt des produits du métabolisme secondaire. Nous pouvons citer comme exemple les alcaloïdes, les terpènes, les stéroïdes, les polyphénols. Ces derniers représentent l'un des groupes les plus importants des produits du métabolisme secondaire, du fait qu'ils aient une faible toxicité et de nombreux avantages biologiques, notamment thérapeutiques, pharmaceutiques, cosmétologiques et alimentaires (**Duraffourd et al., 1997**).

Désormais, de nouvelles sources végétales d'antioxydants naturels sont recherchées dont les polyphénols qui sont des composés naturels largement répandus dans le règne végétal, qui ont une importance croissante grâce à leur rôle d'antioxydants naturels (**Dugas et al., 2000**). Plusieurs métabolites secondaires ont été isolés et identifiés d'*Artemisia herba alba* Asso, dont les plus importants sont les sesquiterpènes lactones produits avec une grande diversité structurale au sein du genre *Artemisia* et des flavonoïdes (**Mohamed et al., 2010 ; Kundan et Anupam, 2011**). Pendant des siècles, les espèces du genre *Thymus* ont été utilisées couramment dans plusieurs pays comme épices (**Ismaili et al., 2004**), selon (**Chun et al., 2001**), Le genre *Thymus* L. est originaire de la région méditerranéenne (**Wang et al., 2004**), où 110 espèces ont été recensées (**Morales et Lagasalia, 1997**). Ce genre appartient à la famille des Lamiaceae (**Harley et al., 2004**).

Le biofilm est une communauté structurée de micro-organismes, fixée à une surface inerte ou vivante et réunis au sein d'une matrice d'exopolysaccharides adhésive et protectrice qu'ils sécrètent. Il représente le mode de vie majoritaire des micro-organismes dans l'environnement (**Espinasse et al., 2010**). Les biofilms sont la source de nombreux problèmes dans l'industrie agro-alimentaire, en termes d'hygiène alimentaire et d'altération des qualités organoleptiques des produits alimentaires. Ils sont présents dans tous les secteurs : laiteries, brasseries, meuneries, sucreries, salaisonneries, etc. (**Jeyasekaran et al., 2000**).

Notre travail a été basé sur l'étude de l'effet antioxydant des extraits méthanoliques des deux plantes *Thymus capitatus* L. (Thym) et *Artemisia herba-alba* Asso (l'armoise) et de prouver leurs activités antibiofilm et antimicrobiennes vis-à-vis les deux espèces *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* responsables d'intoxication alimentaire.

Pour réaliser ce travail nous avons établi dans une première partie, une recherche bibliographique qui comporte trois chapitres :

Le premier chapitre, présente des données botaniques sur les plantes étudiées *Thymus capitatus* (L.) et *Artemisia herba-alba* (Asso).

Alors que dans le deuxième chapitre nous aborderons des généralités sur les composés phénoliques.

Et le troisième chapitre comporte des généralités sur les biofilms bactériens formés par les deux souches *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*.

Dans la deuxième partie, nous avons procédé à une approche expérimentale qui s'adresse aux étapes suivantes :

- ✓ Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes contenus dans les extraits de plantes *Thymus capitatus* et *Artemisia herba alba*.
- ✓ Evaluation de l'activité antioxydante par les deux méthodes DPPH et FRAP
- ✓ Activité antibactérienne et antibiofilm des extraits méthanoliques des deux plantes étudiées.
- ✓ Evaluation de l'influence des deux enzymes, la trypsine et la protéinase K sur la croissance et l'adhérence des deux espèces *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*.

Chapitre I :



*Les plantes
médicinales*

1. Rappel botanique

Les plantes médicinales ont été employées pendant des siècles comme remèdes pour les maladies humaines parce qu'elles contiennent des composants de valeurs thérapeutiques. Toutes fois, malgré les énormes progrès réalisés par la médecine moderne, la phytothérapie offre de multiples avantages, n'oublions pas que de temps en temps et à l'exception de ces cents dernières années, les hommes n'ont eu que les plantes pour se soigner, qu'il s'agisse des maladies bénignes, rhum ou toux ou plus sérieuses tel que la tuberculose ou la malaria (**Eddouks et al., 2007**).

2. Les plantes étudiées

2.1. *Thymus capitatus* (L.)

2.1.1. Définition

Le thym est un arbuste odorant qui pousse spontanément dans le Nord de l'Afrique (l'Algérie, le Maroc, la Tunisie et le Libye), l'Égypte, l'Espagne ainsi qu'en Sibérie et en Europe Nordique. Cependant, la plupart des espèces se concentrent dans le pourtour du bassin Méditerranéen (**Morales, 1997 ; Salgueiro et al., 1997 ; Pedersen, 2000**).

Thymus capitatus (*Thym*, "*Zaatar*") est une plante qui appartient à la famille des Labiées, raide, dressée, à rameaux étalés. C'est un sous-arbrisseau de 20 à 40 cm de hauteur à feuilles petites linéaires ou linéaires-lancéolées, aiguës, ponctuées-glandulaires. Les fleurs sont roses et visibles de mai à octobre, à odeur très agréable et spécifique. Le *thym* est très utilisé en médecine traditionnelle sous plusieurs formes : les feuilles sont utilisées en infusion contre la toux, en décoction pour guérir les maux de tête, hypertension et gastrites, en usage externe comme cicatrisants et antiseptiques (**Le Floc'h, 1983**).

En Algérie, le genre *Thymus* regroupe 12 espèces qui sont : *Thymus fontanesii*, *Thymus commutatus* (Ball.), *Thymus dreatensis*, *Thymus numidicus*, *Thymus guyonii*, *Thymus lanceolatus*, *Thymus pallidus*, *Thymus glandulosus*, *Thymus hirtus*, *Thymus algeriensis*, *Thymus ciliatus*, et *Thymus capitatus* (L.) (**Quezel et Santa, 1963**).



Figure 1 : *Thymus capitatus* (L.).

2.1.2. Noms vernaculaires

- En français : Thym (**Quezel et Santa, 1963**).
- En arabe : Zaatar (**Kabouche et al., 2005**).

2.1.3. Position systématique

D'après **Quezel et Santa (1963)**, la systématique de *Thymus capitatus* est la suivante :

- Embranchement : Phanérogames ou Spermaphytes
- Sous-embranchement : Angiospermes
- Classe : Eudicots
- Sous-classe : Astéridées
- Ordre : Lamiales
- Famille : Lamiacées
- Genre : Thymus
- Espèce : *Thymus capitatus* (L.)

2.2. *Artemisia herba-alba* (Asso)

2.2.1. Définition

Artemisia herba-alba Asso (Armoise blanche, "Chih") est une plante vivace de 30-50 cm de long appartenant à la famille des Astéracées, ligneux bas toujours vert, dont la croissance végétative a lieu à l'automne (feuilles de grande taille) puis dès la fin de l'hiver et au printemps (feuilles plus petites). L'armoise blanche se développe dans les zones bioclimatiques qui vont de la partie supérieure semi-arides à la partie inférieure subaharienne (**Gharabi et al., 2008**). Cette plante se caractérise par une odeur de thymol, très verdoyante et avec de jeunes branches tomenteuses, les feuilles sont coutres, généralement pubescentes, argentées, de natipartites (**Le Floc'h, 1983**). Les fleurs sont hermaphrodites, emballés dans des petits capitules comprenant chacun de 3 à 8 fleurs) sessiles et en bottes.



Figure 2 : *Artemisia herba alba* (Asso)

2.2.2. Noms vernaculaires

- En français : Armoise (**Quezel et Santa, 1963**).
- En arabe : Chih

2.2.3. Position Systématique

Le genre *Artemisia* appartient à la famille des Astéracées (Composites), il comprend environ 400 espèces regroupées en quatre sections : Abrotanum, Absinthium, Seriphidium et dracunculus.

La classification de l'*Artemisia herba alba* la plus utilisée dans la systématique du genre *Artemisia* est celle donnée par Quenzel et Santa (**Quezel et Santa, 1963**) :

- Embranchement : Phanérogames ou Spermaphytes
- Sous-embranchement : Angiospermes

- Classe: Dicotylédones gamopétales
- Sous-classe : Gamopétale Epigynes Isotémones
- Ordre Astérales
- Famille : Syntherées ou composés
- Sous-famille : Tubiliflores
- Tribu : Anthémidées
- Genre : Artemisia
- Espèce : *Artemisia herba alba* Asso (chih)

2.2.4. Composition chimique

Artemisia herba alba constitue un fourrage particulièrement intéressant. En effet, la plante présente un taux de cellulose beaucoup moins élevé que ne laisse préjuger son aspect (17 à 33%). La matière sèche apporte entre 6 et 11 % de matière protéique brute dont 72% est constituée d'acides aminés. Le taux de bêta carotène varie entre 1.3 et 7 mg/kg selon les saisons (**Da Silva, 2004**).

2.2.5. Ecologie

L'Armoise herbe blanche existe dans bioclimats allant du semi-aride jusqu' au saharien (entre les isohyètes de 150 à 500 mm). Elle semble indifférente aux altitudes et peut vivre dans des régions d'hiver chaud à frais, cette espèce est abondante dans le centre sur des sols à texture fine, assez bien drainées (marnes, marno-calcaires en pente).

Dans le sud, elle pousse sur des sols bruns steppiques de texture moyenne et en extrême sud sur des sols sableux. L'armoise résiste à la sécheresse, supporte le gypse et des niveaux de salinité modérément élevés. Dans les steppes, les groupements *d'Artemisia herba-alba* sont marqués par deux strates : une strate de ligneux bas (environ 40 cm du sol) et une autre constituée d'herbacées annuelles (hauteur moyenne de 20 cm) (**Nabli, 1989**).

2.2.6. Phytochimie

Plusieurs métabolites secondaires ont été isolés de *l'Artemisia herba alba*, peut-être les plus importants sont les sesquiterpènes lactones. D'autres études ont été portées sur les flavonoïdes (**Ahmed et al., 1990 ; Boriky et al., 1996**).

Les flavonoïdes détectés dans *l'Artemisia herba alba* montrent aussi une diversité structurale allant des flavonoïdes communs (flavones glycosides et favonols) jusqu'à les flavonoïdes méthylés qui sont très inhabituel (**Saleh et al., 1985**). Les flavonoïdes glycosides comprennent des O-glycosides tels que quercitrine-3-glucoside, mais aussi des flavones C-glycosides qui sont rares dans le genre *Artemisia*, ainsi que dans l'ensemble des *Astraceae*.

2.2.7. Utilisations de la plante en phytothérapie

En commun avec plusieurs d'autres espèces de ce genre, *L'Artemisia herba-alba* (*Asso*), plante caractéristique du moyen-orient et d'Afrique du Nord (**Feinbrun-Dothan, 1978**), est utilisée en médecine traditionnelle pour traiter plusieurs maladies y compris l'entérite et les troubles intestinaux (**Yashphe et al., 1987**), elle est aussi utilisée en tant que remède de l'inflammation du tractus gastro-intestinal (**Eidi et al., 2009**).

Cette espèce a des vertus purgatives évidentes jouant un grand rôle dans le contrôle des vers intestinaux, en particulier des ovins, mais pouvant également entraîner la mort de jeunes agneaux. Les feuilles de cette espèce sont utilisées en médecine traditionnelle pour soigner le diabète, bronchite, abcès, diarrhée et comme vermifuge. Plusieurs études scientifiques ont également prouvées l'efficacité de l'armoise blanche en tant qu'agent antidiabétique (**Barham et Trinder, 1972**), leshmanicide (**Rifai et al., 1999**), antiparasitaire, antibactérien, antiviral, antioxydant, antimalarien, antipyrétique, antispasmodique et antihémorragique (**Deyama et al., 2006**).

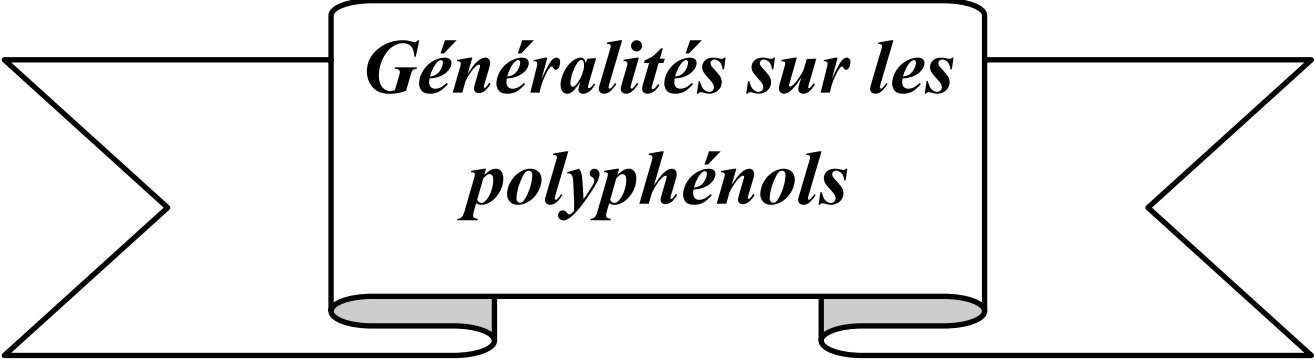
2.2.8. Activité antimicrobienne des extraits des plantes

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

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

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

Chapitre II :



*Généralités sur les
polyphénols*

1. Généralités

Les composés phénoliques ou les polyphénols sont des métabolites secondaires largement répandues dans le règne végétal étant trouvés dans tous les fruits et les légumes. Ces composés sont présents dans toutes les parties des plantes mais avec une répartition quantitative qui varient entre les différents tissus. Plus de 8000 structures ont été identifiées (**Waksmundzka-Hajnos et Sherma, 2011**), allant de simples molécules comme les acides phénoliques à des substances hautement polymérisées comme les tanins (**Dai et Mumper, 2010**). Ils sont synthétisés par l'ensemble des végétaux et ils participent aux réactions de défense face à différents stress biotiques (agents pathogènes, blessures, symbiose) ou abiotiques (lumière, rayonnements UV, faible température, carences). Les polyphénols contribuent à la qualité organoleptique des aliments issus des végétaux (couleur, astringence, arôme, amertume) (**Visioli et Galli, 2000**).

La nature et la fonction des composés phénoliques s'accumulant dans les plantes sont variables. Ils présentent des propriétés antimicrobiennes; ce sont des phytoalexines. Ces composés de défense regroupent différentes classes de composés tels que les isoflavonoïdes prénylés, les stilbènes, les coumarines, les flavonols ou encore les auronnes. D'autres composés ont des fonctions dans la signalisation comme l'acide salicylique, molécule signal dans les mécanismes de résistance. La blessure et l'attaque par des herbivores induisent la synthèse de l'acide chlorogénique ou d'esters phénoliques liés aux parois cellulaires, ces composés pouvant agir directement en tant que molécules de défense ou servir de précurseurs à la synthèse de la lignine, de la subérine et autres barrières polyphénoliques. Par ailleurs, la quantité d'anthocyanines augmente fortement après un stress au froid ou un stress nutritionnel (**Hoffmann, 2003**).

Les polyphénols sont caractérisés par la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : ether, ester, hétéroside (**Bruneton, 1999**). Ils sont communément subdivisés en acides phénoliques (dérivés de l'acide benzoïque ou dérivés de l'acide cinnamique), coumarines, stilbènes, flavonoïdes, lignanes, lignines, tanins (**Cheyrier, 2005**). Le tableau 1 du regroupe les principales classes des composés phénoliques (**Macheix *et al.*, 2005**).

Tableau 1 : Les principales classes des composés phénoliques.

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine (exemple)
C6	Phénols simple	Catéchol	
C6-C3	Acides hydroxybenzoïques	p-Hydroxybenzoïques	Epices, fraise
C6-C3	Acides hydroxycinnamique	Acide caféique, acide férulique	Pomme de terre, pomme
	Coumarines	Scopolétine, esculétine	Citrus
C6-C2-C6	Silènes	Resvératrol	Vigne
C6-C3-C6	Flavonoïdes		
	<ul style="list-style-type: none">• Flavonols	Kamphérol, quercétine	Fruits, légumes, fleurs
	<ul style="list-style-type: none">• Anthocyanes	Cyanidine, pélargonidine	Fleurs, fruits rouges
	<ul style="list-style-type: none">• Flavanols	Catéchine, épicatechine	Pomme, raisin
	<ul style="list-style-type: none">• Flavanones	Naringénine	Citrus
	<ul style="list-style-type: none">• Isoflavonols	Daidzéine	Soja
(C6-C3) ₂	Lignanes	Pinorésinol	Pin
(C6-C3) _n	Lignines		Bois, noyau de fruits
(C15) _n	Tanins		Raisin rouge, kaki

2. Biosynthèse des polyphénols

Les composés phénoliques sont issus par deux grandes voies métaboliques : la voie de l'acide shikimique et la voie de l'acétate/malonate.

2.1. Voie de l'acide shikimique

La voie de l'acide shikimique (**figure 3**) est la voie la plus importante pour la biosynthèse des composés aromatiques dans les plantes et les micro-organismes, y compris les acides aminés aromatiques : la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane. Ce sont des métabolites primaires qui servent de précurseurs pour de nombreux de produits naturels (secondaires) tels que les flavonoïdes, les acides phénoliques, les coumarines, les alcaloïdes... (**Ghasemzadeh, 2011**).

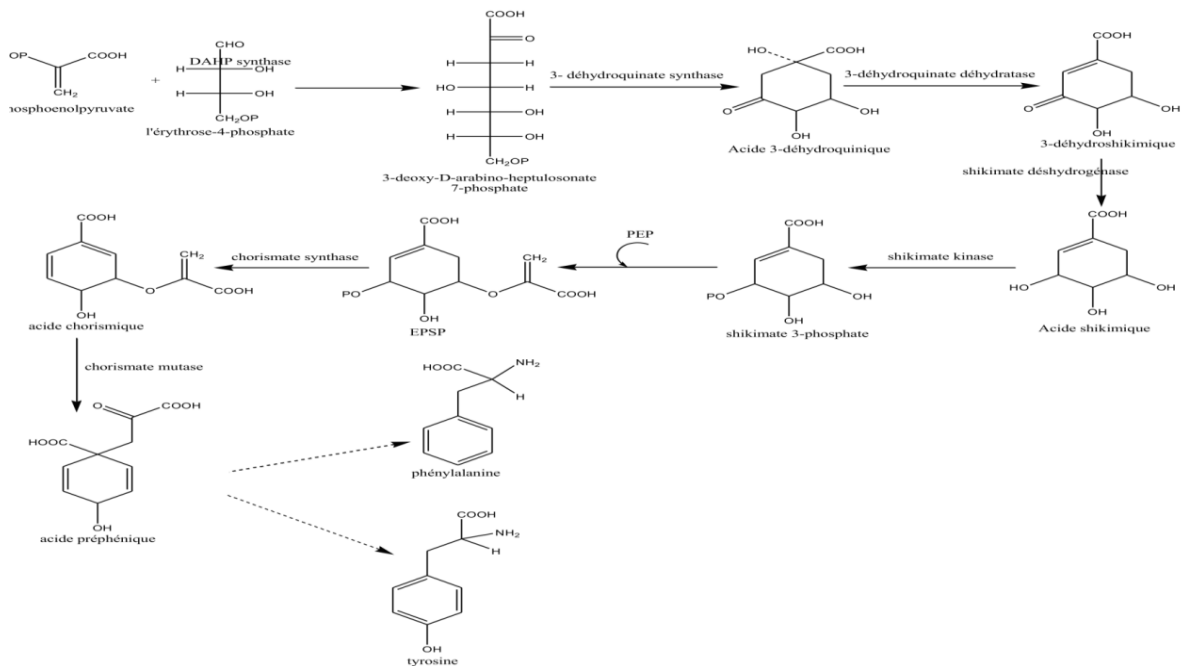


Figure 3 : Voie de l'acide shikimique.

2.2. Voie de l'acétate / malonate

La glycolyse et la β -oxydation aboutissent à la formation de l'acétylCoA donnant le malonate. C'est à travers cette voie que s'effectue la cyclisation des chaînes polycétoniques, obtenues par condensation répétée d'unités « Acétate » qui se fait par carboxylation de l'acétyl-CoA. Cette réaction est catalysée par l'enzyme acétyl-CoA carboxylase (Akroum, 2010).

3. Classification des polyphénols

Les polyphénols peuvent se regrouper en deux grands groupes : Les non flavonoïdes dont les principaux composés sont : les acides phénoliques, les stilbènes, les lignanes, les lignines et les coumarines (Hoffmann, 2003). et les flavonoïdes, dont on caractérise principalement : les flavones, flavanones, flavonols, isoflavonones, anthocyanines, proanthocyanidines et flavanols (Pincemail *et al.*, 2007).

3.1. Les non flavonoïdes

3.1.1. Acides phénoliques (C6-C1 ou C6-C3)

Les acides phénoliques font partie des formes les plus simples des composés phénoliques et se séparent en deux grands groupes distincts qui sont les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques. Les acides hydroxybenzoïques existent fréquemment sous formes d'esters ou de glycosides (Macheix *et al.*, 2005). Les principaux acides hydroxybenzoïques retrouvés dans les

végétaux sont les acides phydroxybenzoïque, protocatéchique, vanillique, gallique et syringique (**Chanforan, 2010**).

Les acides hydroxycinnamiques sont retrouvés dans toutes les parties des fruits et des légumes, quoique les concentrations les plus élevées soient observées dans la partie externe du fruit mûr (**De La Rosa et al., 2009**).

3.1.2. Stilbènes (C6-C2-C6)

Les stilbènes présentent une structure en C6-C2-C6, avec un cycle A portant deux fonctions hydroxyles en position méta et un cycle B portant des fonctions hydroxyles ou méthoxyles en métal, ortho et para. Les deux noyaux aromatiques sont reliés par un double liaison, formant un système conjugué.

Ces composés sont présents dans de nombreuses familles de plantes supérieures mais les principales sources alimentaires sont le raisin (les graines, la peau, et les tiges) et le vin (**Sun et al., 2006**).

3.1.3. Lignanes (C6-C3)₂

Les lignanes répondent à une représentation structurale de type (C6-C3)₂, l'unité (C6 - C3) est considérée comme un propylbenzène. Ce sont des composés phénoliques bioactifs, non-nutritifs, non caloriques. On les trouve en plus forte concentration dans le lin et les graines de sésame et en faibles concentrations dans les fruits et les légumes (**Peterson et al., 2010**).

3.2. Les flavonoïdes C6-C3-C6

Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 6000 composés naturels qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires. Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange, et rouge de différents organes végétaux. (**Ghedira, 2005**). Tous les flavonoïdes possèdent la même structure de base (C6-C3-C6), ils contiennent quinze atomes de carbone dans leur structure de base : deux cycles aromatiques A et B à six atomes de carbones (**figure 4**) liés avec une unité de trois atomes de carbone qui peut ou non être une partie d'un troisième cycle C (**Tapas et al., 2008**).

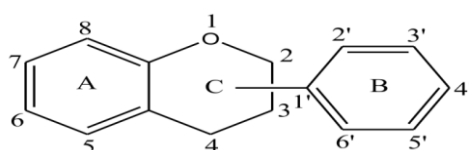


Figure 4 : Structure de base des flavonoïdes

Plus de 4000 flavonoïdes ont été identifiés dans les plantes, et la liste ne cesse de croître. C'est à cause de l'apparition de nombreux modèles de substitution ; les substituants primaires (groupe hydroxyle) peuvent eux-mêmes être substitués (glycosylés ou acylés) donnant parfois des structures très complexes (**D'Archivio et al., 2007**). Les principales classes des flavonoïdes sont : les flavonols les flavones, les flavanones, les flavan-3-ols, les isoflavones et les anthocyanes (**Sadasivam et al., 2003**), ils varient dans leurs caractéristiques structurales par la diversité fonctionnelle autour de l'oxygénation de l'hétérocycle.

3.3. Tanins

Les tanins sont des substances polyphénoliques de structures variées, ayant en commun la propriété de tanner la peau, c'est-à-dire de rendre imputrescible. Ces substances ont en effet la propriété de se combiner aux protéines, ce qui explique leur pouvoir tannant. Très répandu dans le règne végétal ils peuvent exister dans divers organes, mais on note une accumulation plus particulièrement dans les tissus âgés ou d'origine pathologique. Ils sont localisés dans les vacuoles, quelques fois combinés aux protéines et aux alcaloïdes. On distingue: les tanins hydrolysables et les tanins condensés (**Roux et Catier, 2007**).

Les tanins sont largement répandus dans les organismes végétaux et plus particulièrement dans les fruits, les graines de céréales et diverses boissons. Dans l'alimentation humaine, les sources les plus importantes de tannins sont le vin et le thé (**Pénicaud, 2009**).

4. Polyphénols dans les plantes : Localisation et intérêt

A l'échelle de la cellule, les composés phénoliques sont principalement répartis dans deux compartiments : les vacuoles et la paroi. Dans les vacuoles, les polyphénols sont conjugués, avec des sucres ou des acides organiques, ce qui permet d'augmenter leur solubilité et de limiter leur toxicité pour la cellule.

Au niveau de la paroi, on trouve surtout de la lignine et des flavonoïdes liés aux structures pariétales. Les composés phénoliques sont synthétisés dans le cytosol. Une partie des enzymes impliquées dans la biosynthèse des phénylpropanoïdes est liée aux membranes du réticulum endoplasmique, où elles sont organisées en métabolons (**Bénard, 2009**).

Au niveau tissulaire, la localisation des polyphénols est liée à leur rôle dans la plante et peut être très caractéristique. Au sein même des feuilles la répartition des composés est variable, par exemple les anthocyanes et les flavonoïdes sont majoritairement présents dans l'épiderme. Au niveau de la plante entière, il faut noter que certains composés ne sont accumulés que dans des organes bien définis. Chez la pomme par exemple, les composés phénoliques interviennent au

niveau de la coloration de la peau via les anthocyanes, et dans la qualité organoleptique de la chair, notamment pour l'amertume ou l'astringence (**Bénard, 2009**).

Les composés phénoliques jouent un rôle important dans le métabolisme de la plante mais aussi peuvent réagir dans les interactions des plantes avec leur environnement biologique et physique (relations avec les bactéries, les champignons, les insectes, résistance aux UV). Toutes les catégories de composés phénoliques sont impliquées dans les mécanismes de résistance (**Dicko et al., 2006**). Ils assurent la communication entre cellules, entre végétaux et entre végétaux et animaux (**Robert et Catesson, 2000**).

6. Stress oxydatif

Des molécules prooxydantes appelées radicaux libres ou espèces réactives de L'oxygène (ERO) sont produites quotidiennement dans l'organisme. Ces dernières sont cependant contrôlées par les antioxydants. Un stress oxydatif survient lorsque l'équilibre est rompu en faveur des radicaux libres. Toutefois, une production excessive de ces molécules réactives ou une insuffisance des mécanismes antioxydants peut déséquilibrer la balance oxydant/antioxydant (**Papazian et Roch, 2008; Christophe, 2011**).

Ce déséquilibre peut avoir diverses origines, telle que l'exposition aux radiations ionisantes (exposition importante au soleil, radioactivité artificielle ou naturelle), la pollution, le contact avec certains pesticides et solvants, la consommation de tabac et d'alcool, la prise de certains médicaments, la pratique du sport intensif et tout processus susceptible de surcharger les réactions de détoxification hépatique, notamment une perte de poids importante (**Poirier, 2004 ; Médart, 2009**).

8. Intérêts thérapeutiques des polyphénols

La principale caractéristique des polyphénols c'est qu'ils sont des agents antioxydants très puissants. En effet, ils sont capables de piéger les radicaux libres et d'activer les autres antioxydants présents dans le corps. Cette même activité antioxydante permet aux polyphénols de réguler les radicaux libres bon-mauvais, comme l'oxyde nitrique qui favorise une bonne circulation sanguine, coordonne l'activité du système immunitaire avec celle du cerveau et module la communication entre les cellules de ce dernier (**Akroum, 2010**).

L'activité antioxydante des polyphénols peut s'exercer sur les transporteurs des lipides du sang et tout particulièrement sur le « mauvais » transporteur du cholestérol (les LDL ou les lipoprotéines de faible densité). Les polyphénols empêchent ainsi la formation des LDL oxydés, formation qui rend place lors d'états pathologiques variés caractérisés par un stress oxydatif (**Descheemaeker, 2003**). Ils aident à combattre l'inflammation et réduisent la fragilité des

capillaires, ils réduisent les effets du diabète et protègent la peau contre les rayons ultraviolets en diminuant les dommages causés par les rayons solaires (**Spiller, 2007**).

9. Enzymes

Les enzymes sont des protéines, présentes dans tous les organismes vivants et responsables de la catalyse (accélération) de différentes réactions chimiques. Il existe un nombre très important d'enzymes et on en découvre encore aujourd'hui de nouvelles. Six classes d'enzymes sont répertoriées selon la réaction chimique qu'elles catalysent : les oxydoréductases, les transférases, les hydrolases, les lyases, les isomérasés et les ligases. Une enzyme est spécifique d'un substrat, molécule dont elle catalyse la transformation. A la fin de la réaction la structure de l'enzyme se retrouve inchangée. Leur mode d'action est basé sur la reconnaissance spécifique du substrat par un domaine particulier chez l'enzyme (site actif ou site catalytique). Des facteurs comme le pH ou la température, pouvant influencer cette structure tridimensionnelle ou encore l'état d'ionisation du site actif, affectent fortement l'activité enzymatique. Chaque enzyme possède donc une température et un pH d'activité optimale (**Leroy, 2006**).

Les enzymes produites en quantités industrielles sont majoritairement d'origine microbienne. Leurs applications concernent principalement les détergents et le secteur agroalimentaire (**Leroy, 2006**).

Chapitre III:



*Les biofilms
bactériens*

III. Les biofilms bactériens

1. Généralités

Dans les écosystèmes naturels, les micro-organismes vivent généralement au sein de communautés microbiennes appelées biofilms. Un biofilm est constitué de microorganismes adhérant à une surface ou une interface en milieu humide ou aqueux (**Costerton *et al.*, 1994**), on parle alors de communautés microbiennes sessiles. Ces micro-organismes sont englobés dans une matrice généralement constituée de polymères extracellulaires ou EPS ("extrapolymeric substances") sécrétés par ces mêmes microorganismes. Les EPS renferment en majorité des polysaccharides macromoléculaires et en moindre mesure des protéines, des lipides et acides nucléiques (**Flemming *et al.*, 1999 ; Sutherland, 2001**).

La prédominance du mode de vie sous forme de biofilm ne fut cependant affirmée qu'en 1978 (**Costerton *et al.*, 1978**). Il a été montré que plus de 99% des bactéries se développent en biofilms (**Coghlan, 1996 ; Donlan et Costerton, 2002**) sur une grande variété de surfaces telles que les métaux, les plastiques, les tissus vivants (tissus humains, feuilles et racines des végétaux), les surfaces minérales (pierres, bétons). Un biofilm peut être constitué d'une seule espèce bactérienne ou de plusieurs espèces de bactéries mais de champignons, algues, protozoaires (**Lock, 1993**).

Les bactéries contenues dans un biofilm présentent des caractéristiques très différentes de leurs homologues planctoniques (bactéries libres en suspension) parmi lesquelles des modifications structurales (par exemple la disparition des flagelles, (**Flemming, 1990 ; Costerton *et al.*, 1995**), la production d'exopolymères, la mise en place d'un système de communication chimique ("quorum sensing") (**Parsek et Greenberg, 2000**), une augmentation significative de leur résistance aux agents antimicrobiens (désinfectants ou antibiotiques) et aux stress environnementaux (déshydratation, privation nutritionnelle, rayonnements ultraviolets...)

2. Formation des biofilms

La formation d'un biofilm bactérien sur une surface solide est un phénomène complexe dans lequel des processus physiques, chimiques et biologiques sont impliqués (**Characklis et Marshall, 1990**). La constitution d'un biofilm mature nécessite plusieurs étapes (**Figure 6**) :

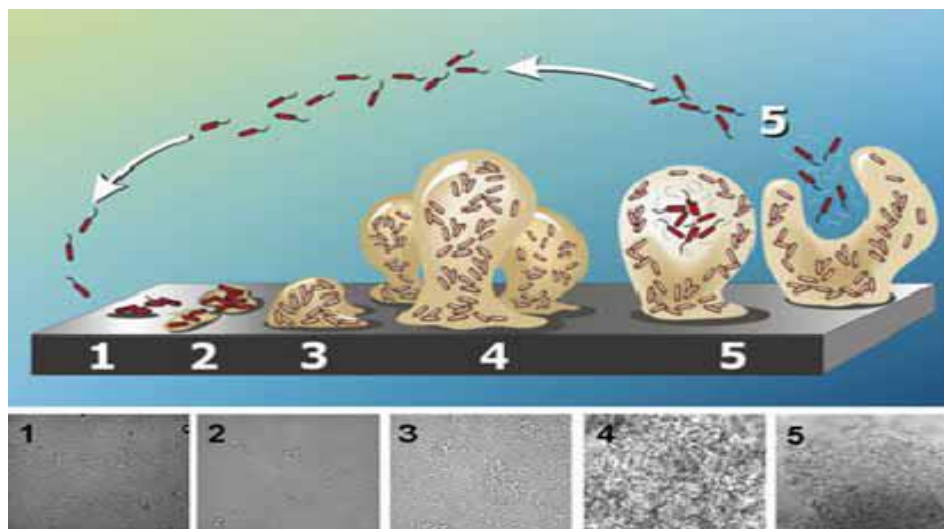


Figure 6 : Représentation schématique des différentes étapes conduisant à la formation d'un biofilm (Stoodley *et al.*, 2002).

3. Biofilm et industrie alimentaire

Les biofilms ont une longue histoire dans l'industrie alimentaire car ils sont responsables de la contamination des produits transformés. L'étude des biofilms dans le milieu des industries alimentaires relève, pour une grande part, du domaine de la sécurité sanitaire des aliments. Presque toutes les branches de l'industrie alimentaire, y compris les secteurs des produits laitiers sont remises en cause par le problème des biofilms (Srey *et al.*, 2013). Les recherches en la matière sont néanmoins récentes. Les biofilms affectent également les transferts de chaleur et donc augmentent les temps de stérilisation par autoclave. Ils modifient aussi la résistance à la vapeur et au formol. Ils sont source de difficultés de nettoyage et de désinfection des surfaces, des instruments et de l'équipement. Ils se forment sur les surfaces et les recoins de chaînes de production et sont considérés comme un risque pour la santé même s'ils ne contiennent que des bactéries inoffensives parce qu'ils constituent un refuge pour les pathogènes (Vlkova *et al.*, 2008).

4. Caractéristiques de l'espèce d'étude *Bacillus cereus*

4.1. Propriétés morphologiques

Les souches de *B. cereus* sont constituées de bacilles Gram positifs ou à Gram variable selon l'âge des cultures, aux extrémités arrondies, généralement mobiles grâce à une ciliature péritriche, d'une longueur supérieure à 3 μm et d'un diamètre moyen de 1.4 μm , souvent groupées en chaînes formant des spores non déformantes ovales (ou parfois cylindriques), en position subterminale (ou parfois en position paracentrale), aéro-anaérobies. Les colonies ont un diamètre compris entre 2 et 7 mm, elles sont soit circulaires soit de formes irrégulières avec des bords ondulés, crénelés ou filamenteux. Leur aspect est crémeux et lisse, mat ou granuleux. Sur gélose au

sang de mouton, elles sont hémolytiques. *B. cereus* possède une catalase, dépourvu d'une oxydase, ne fermentant pas le mannitol, mais possède une phospholipase très active (**Rasko et al., 2005**). (Tableau 2).

Tableau 2 : Critères de différenciation entre quelques espèces du genre *Bacillus*

Species	Colony	Motile	Hemolysis	Susceptibility to Penicillin	Parasporal Body	Virulent to Mice
<i>B. cereus</i>	White	Yes	Yes	No	No	No
<i>B. anthracis</i>	White	No	No	Yes	No	Yes
<i>B. mycoides</i>	Rhizoid	No	No	No	No	No
<i>B. thuringiensis</i>	White/ Grey	Yes	Yes	No	Yes	No

4.2. Habitat et pouvoir pathogène

Bacillus cereus est une bactérie pathogène, gram-positive, formant des spores (**Shinagawa, 1990 ; Juneja et al., 2003**). Ces spores sont capables de résister à une température de 95 °C (Anonyme, 2000). La présence des spores de *B. cereus* pose de sérieux problèmes dans les industries agro-alimentaires car non seulement elles sont résistantes à la chaleur, mais elles ont la capacité d'adhérer fortement à de nombreuses surfaces y compris l'acier inoxydable (**Husmark et al., 1990**). La viande et les produits carnés sont des milieux très riches caractérisés par un risque de sécurité très élevé. La viande fraîche ou cuite sont considérées comme des substrats favorables pour *B. cereus* (**Ternstrom et Molin, 1987 ; Kramer et Gilbert, 1989**). D'autre part, *B. cereus* est communément présente dans d'autres ingrédients comme les épices et persiste dans les équipements de transformations qui peuvent contribuer à une contamination de la viande (**Doyle, 2002 ; Guinebrière et al., 2003**).

4.3. Description taxonomique et physiologique

Les bactéries du groupe *Bacillus cereus* appartiennent à la famille des Bacillaceae et au genre *Bacillus*. Ce sont des bacilles Gram positif, sporogènes, aéro-anaérobies facultatives et possédant une catalase.

4.3.1. Description taxonomique

Le groupe *Bacillus cereus* (*Bacillus cereus* sensu lato) regroupe 6 souches : *Bacillus cereus sensu stricto*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus weihenstephanensis*, *Bacillus mycoides* et *Bacillus pseudomycoides*. Il a été montré que ces espèces sont très proches les unes des

autres au niveau génomique (**Guinebretière et al., 2008**). Ce point a compliqué la tâche des chercheurs pour faire une classification précise au sein du groupe. Ainsi, la première classification au sein du groupe *Bacillus cereus* n'est pas essentiellement basée sur les différences génomiques mais plutôt selon trois caractères phénotypiques spécifiques ; la virulence, la physiologie et la morphologie. (Tableau 3)

Tableau 3 : Nouvelle classification du groupe *Bacillus cereus* d'après (**Guinebretière et al., 2008**).

Groupes phylogénétiques	Espèces du groupe <i>Bacillus cereus</i>	Profils thermiques de croissance	Cytotoxicité
Groupe I	<i>B. pseudomycoïdes</i>	Mésophiles (de 10 à 43°C)	Aucune observée
Groupe II	<i>B. thuringiensis</i> II <i>B. cereus</i> II	Psychrotolérantes (de 7 à 40°C)	Toxines diarrhéiques
Groupe III	<i>B. thuringiensis</i> III <i>B. cereus</i> III <i>B. anthracis</i>	Mésophiles (de 15 à 45°C)	Toxines diarrhéiques et émétiques Anthrax
Groupe IV	<i>B. thuringiensis</i> IV <i>B. cereus</i> IV	Mésophiles (de 10 à 45°C)	Toxines diarrhéiques
Groupe V	<i>B. thuringiensis</i> V <i>B. cereus</i> V	Mésophiles intermédiaires (de 8 à 40°C)	Toxines diarrhéiques
Groupe VI	<i>B. weihenstephanensis</i> <i>B. mycoïdes</i> <i>B. thuringiensis</i> VI	Psychrotolérantes (de 5 à 37°C)	Aucune observée
Groupe VII	<i>B. cereus</i> VII	Thermotolérantes modérées (de 20 à 50°C)	Toxines diarrhéiques

Dans cette classification, les espèces sont donc classées par profil thermique de croissance puis par leur cytotoxicité. De plus, il a été montré que le groupe VII, constitué de *B. cereus* VII, fait en réalité référence à une nouvelle espèce les *Bacillus cytotoxicus* (**Lapidus et al., 2008**). Ainsi, cette nouvelle façon de faire révèle la complexité du groupe *Bacillus cereus* et démontre qu'une espèce peut être présente dans plusieurs groupes à la fois.

4.3.2. Description physiologique

4.3.2.1. La cellule végétative

Bacillus cereus est un long bacille de forme régulière et souvent en courte chaîne. C'est un bacille Gram + qui est mobile, aéroanaérobie facultatif et qui forme des spores non déformantes. Les *B. cereus* se développent sur des géloses ordinaires. Les colonies ainsi obtenues sont grisâtres, larges avec des contours irréguliers.

En galerie Api 20 E les *B. cereus* possèdent les caractères suivants : VP+, citrate+, gélatinase+. Sur gélose au sang de mouton ils possèdent une large hémolyse. b. Les spores Afin de résister à un environnement qui n'est plus favorable à leur développement, certaines bactéries sont capables de

sporuler. Ainsi, lors d'une baisse des nutriments, d'une baisse de l'aw (cf p.12) ou encore d'une variation importante de température, les bactéries du groupe *B. cereus* produisent des spores ultra résistantes par rapport à la forme végétative (Figure 7).

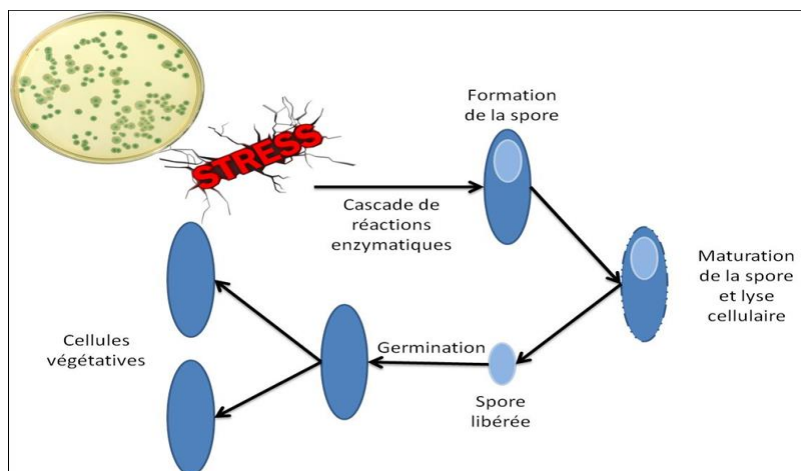


Figure 7 : Processus de sporulation de *Bacillus cereus*

Les spores de *B. cereus* sont très résistantes et possèdent de remarquables capacités d'adhésion aux matières inertes. Leur adhésion sur de multiples surfaces est principalement due à 3 caractéristiques : leur grande hydrophobicité, la faible charge à la surface des spores et enfin leur morphologie avec la présence d'appendices (**Andersson et al., 1995**) (Figure 2)

Lorsque les spores sont libérées, elles peuvent ensuite entrer en germination pour produire de nouvelles bactéries qui seront elles-mêmes capables de se diviser. En industrie agroalimentaire, les spores des bactéries résistent aux traitements thermiques classiques comme la pasteurisation. Ainsi, il n'est pas rare de retrouver de nombreuses traces de ces dernières sur les surfaces de travail ou encore dans les produits commercialisés. Le véritable problème est que la pasteurisation peut activer la germination des spores au lieu de les détruire (**Collado et al., 2003**). Suite à leur activation, les spores germent sous forme végétative pouvant se développer dans un produit en l'absence de flore compétitive (**Samapundo et al., 2011**).

5. *Staphylococcus aureus*

5.1. Historique

Pasteur a observé, en 1879 dans des pus de furoncle et d'ostéomyélites « un organisme unique, formé de petits points sphériques, réunis par couple, rarement par quatre, mais très fréquemment associés en petit amas ». Les Staphylocoques, qu'il venait de décrire sont de cocci à Gram positif très répandus dans la nature (sol, eau, air) et responsables d'un grand nombre d'infections chez l'homme et l'animal. (**bismuth et al., 1984**).

5.2. Habitat

S. aureus est un germe ubiquitaire. Il vit à l'état commensal sur les muqueuses de l'homme et des animaux. Le site de colonisation préférentielle de *S. aureus* chez l'homme est la muqueuse nasale. En effet 30 % des adultes hébergent *S. aureus* de façon permanente, 50 % de façon intermittente et 20 % ne sont jamais porteurs.

A partir des sites de portage, *S. aureus* colonise les territoires cutanés en particulier, les zones humides (aisselle, périnée...) et les mains. La transmission manu portée est le mode essentiel de transmission. Le portage intestinal est assez fréquent. (Ferron ,1984).

5.3. Caractères bactériologiques

5.3.1. Morphologie

S. aureus se présente sous forme de cocci en petits amas, de diplocoques ou de très courtes chaînettes, mesurant 0,8 à 1 µm, gardant le Gram. Sur les cultures en milieu solide il se dispose en "grappes de raisin", alors qu'en milieu liquide, il est souvent isolé, en diplocoques. Il est immobile, non sporulé et ne possède pas de capsule visible au microscope optique sauf de très rares souches ; d'autres souches formant des colonies mucoïdes, sont entourées d'un pseudo capsule. (bismuth *et al.*, 1984).

5.3.2. Caractères cultureux

S. aureus est aérobie anaérobie facultatif et se développe facilement sur les milieux usuels. La température optimale de croissance est de 37 °C (10 à 45 °C), le pH optimal est 7,5 mais de grandes variations sont tolérées. En bouillon ordinaire, la culture est rapide ; un trouble homogène puis un dépôt sont observés. Sur gélose ordinaire, les colonies sont lisses, rondes, bombées et leur diamètre est de un millimètre. La plupart des souches élaborent un pigment jaune doré ou jaunecitrin non diffusible dans le milieu. Le rôle physiologique de ce pigment n'est pas connu. (Fleurette, 1989).

5.3.3. Caractères métaboliques et physiologiques

S. aureus possède une catalase mais pas d'oxydase. Il est actif sur les hydrates de carbone : le glucose est utilisé en anaérobiose et en aérobie ainsi que le mannitol. D'autres caractères peuvent être recherchés : indole, acétoïne, réduction du tellurite de potassium, production d'ammoniaque à partir de l'arginine. (El kouri *et al .*, 1998).

6. Facteurs intervenant dans la colonisation, l'adhésion, l'invasion, la diffusion

6.1. La protéine de liaison au collagène

L'attachement au collagène est nécessaire et suffisant pour l'adhésion de *S. aureus* au cartilage in vitro. Ce récepteur du collagène pourrait constituer un facteur de virulence important dans les infections osseuses et articulaires à *S. aureus* (**Buckingham et al., 2004**).

6.2. La protéine de liaison à la fibronectine

Les récepteurs pour la fibronectine contribuent à l'adhérence de *S. aureus* aux caillots plasmatiques et aux biomatériaux ayant un contact prolongé avec le sang. Ils ont ainsi un rôle important dans l'initialisation des infections sur corps étrangers. (**El kouri et al., 1998**).

6.3. La protéine de liaison au fibrinogène (clumping factor)

C'est une protéine de surface qui provoque l'agrégation des bactéries en présence de plasma. Elle constitue un facteur de virulence pour les plaies et les infections sur corps étrangers. (**El kouri et al., 1998**).

6.4. Les sidérophores

Le fer est indispensable à la croissance des staphylocoques et l'une des méthodes de défense de l'hôte est la diminution de la fraction disponible du fer (fixation à la lactoferrine et à la transferrine). *S. aureus* s'adapte en sécrétant des sidérophores capables de capter et de transporter le fer dans la bactérie. La quantité produite dépend de l'origine pathologique des souches. Le niveau de la production de siderophores a été corrélé avec la forte expression de certaines protéines. Certaines souches virulentes de *S. aureus* pourraient produire 2 types de siderophores : un premier dont la production serait limitée par des gènes chromosomiques et un second synthétisé par des plasmides à des quantités beaucoup plus élevées (**Cox et al., 1995**).

6.5. La coagulase

La coagulase n'est pas une enzyme mais une protéine extracellulaire qui se lie à la prothrombine de l'hôte. La thrombine ainsi activée transforme le fibrinogène en fibrine. C'est un marqueur de l'identification de *S. aureus* (test de la coagulase en tube). Il n'existe pas d'argument évident indiquant un rôle de la coagulase dans la virulence des souches (**Baggett et al., 2004**). Cependant, on peut considérer logiquement qu'elle intervient dans la constitution des thrombophlébites staphylococciques et que le caillot permet aux bactéries qu'il contient de se protéger contre les défenses de l'hôte.



*Partie
expérimental*



*Matériel et
méthode*

1. Obtention des extraits de plante

Le matériel végétal est constitué des parties aériennes de *Thymus capitatus* (L.) et *Artemisia herba-alba* (Asso). Les feuilles du thym ont été recueillies de la région de Safsaf wilaya de Mostaganem, tandis que les feuilles de l'Armoise ont été recueillies de la région de Saida. Les deux extraits ont été obtenus par extraction sous reflux en utilisant le méthanol comme solvant.

2. Dosage des polyphénols totaux

2.1. Principe

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué par une méthode adaptée par Singleton et Rossi (1965) avec le réactif de folin–Ciocalteu. Le réactif de Folin Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (**Ribéreau, 1968**). La coloration produite, dont l'absorption maximum à 765nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (**Boizot et Charpentier, 2006 ; Ghazi et Sahraoui, 2005**).

2.2 .Mode opératoire

Une solution stock à une concentration de 2mg/ml d'extrait de chaque plante a été préparée dans de l'eau distillée, un volume de 0,5ml de chaque dilution de la solution stock a été mélangé avec 5ml de réactif de Folin Ciocalteu (FCR) dilué dans l'eau distillée (1 :10). Après 6 minutes, 4 ml de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 7,5% a été ajouté. Après une incubation du mélange réactionnel pendant une heure à une température ambiante et à l'obscurité, L'absorbance a été mesurée à 765 nm. Les mêmes procédures ont été suivies pour préparer la courbe étalon en remplaçant le volume d'extrait par l'acide gallique. Toutes les mesures sont répétées 3 fois. Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait.

3. Dosage des flavonoïdes

3.1. Principe

Le dosage des flavonoïdes de nos extraits a été réalisé par la méthode colorimétrique décrite par (**Zhishen et al., 1999**), basée sur la formation de complexes entre les composés phénoliques et le trichlorure d'aluminium. Les complexes produits sont de couleur jaune absorbent dans le visible à 510 nm.

3.2. Mode opératoire :

Une solution stock à une concentration de 2mg/ml d'extrait de chaque plante a été préparée dans l'eau distillée, un volume de 200 µl de nitrite de sodium $NaNO_2$ à 0,5% a été mélangé avec 2 ml de chaque dilution de la solution stock. Après 6 min, 200µl de chlorure d'aluminium $AlCl_3$ à 1%

a été ajouté au mélange. Ensuite, 2 ml d'hydroxyde de sodium NaOH à 1M a été ajouté. Après une incubation du mélange réactionnel pendant 30 min à température ambiante et à l'obscurité, L'absorbance a été mesurée à 510 nm. Toutes les manipulations sont répétées 3 fois.

La teneur en flavonoïdes a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée par la quercetine à différentes concentrations dans les mêmes conditions que les échantillons. Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent de quercetine par gramme d'extrait.

4. Etude de l'activité antioxydante

Pour évaluer l'effet antioxydant des extraits des deux plantes *Artemesia herba alba* et *thymus capitatus*, deux techniques ont été réalisées : en utilisant le radical 2.2'-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) et la technique FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).

4.1. Méthode DPPH (2.2'-diphényl-1-picrylhydrazyl)

4.1.2. Principe

L'activité antiradicalaire des composés phénoliques contenus dans les extraits préparés a été évaluée en mesurant leurs capacités de piéger le radical libre DPPH (2.2'-diphényl-1-picrylhydrazyl) sa couleur violette foncée se transforme en jaune lors de sa réduction (capté par les produits testés) (Zeghad, 2009).

4.1.3. Mode opératoire :

Une solution de 1mM de DPPH a été préparée dans le méthanol absolu, un volume de 2ml de chaque dilution de la solution mère (2mg /ml) a été mélangé avec 0,5 ml de la solution DPPH. Après l'incubation à l'obscurité à une température ambiante pendant 30 min, l'absorbance a été mesurée à 517 nm (Atoui *et al.*, 2005).

Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition (I%) :

$$\text{Pourcentage d'inhibition \%} = \frac{(\text{Abs contrôle} - \text{Abs test})}{\text{Abs contrôle}} \times 100$$

Abs c : Absorbance du contrôle sans extrait après 30 min

Abs e : Absorbance de l'échantillon testé après 30 min

La variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations d'extrait nous a permis de calculer la concentration efficace (efficient concentration value: EC50). Cette dernière est définie comme la quantité d'antioxydant nécessaire pour diminuer la concentration initiale du DPPH à 50%.

4.2. Méthode FRAP (Ferric reducing antioxidant power)

4.2.1. Principe

Le pouvoir réducteur d'une molécule est relatif à sa capacité de transfert des électrons et peut servir comme indicateur significatif de son activité antioxydante. Dans cette technique, la couleur jaune de la solution change au vert et bleu selon le pouvoir réducteur de l'échantillon testé. Et, une absorbance élevée à 700 nm indique un pouvoir réducteur élevé (**Zovko Končić et al., 2010**).

4.2.2. Mode opératoire

Une solution stock à une concentration de 2mg/ml d'extrait de chaque plante a été préparée dans de l'eau distillée, 1 ml de chaque dilution de la solution stock a été mélangé avec 2,5ml d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5ml d'une solution de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ à 1%. L'ensemble a été incubé au bain marie à 50°C pendant 20 minutes ensuite; 2,5ml d'acide trichloroacétique à 10% a été ajouté pour stopper la réaction. Après la centrifugation à 3000 rpm pendant 10 minutes; 2,5ml du surnageant ont été mélangés avec 2,5ml d'eau distillée et 0,5ml d'une solution de chlorure de fer à concentration 0,1%.

La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700nm contre un blanc préparé, en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée qui permet de calibrer l'appareil (UV-VIS spectrophotomètre). Toutes les mesures ont été répétées 3 fois. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (**Hubert, 2006**).

5. Méthode d'étude du pouvoir antibactérien des extraits de plante

L'effet antibactérien a pour but de rechercher l'activité biologique de chaque extrait des deux plantes, *Thymus capitatus* et *Artemisia herba alba* vis-à-vis des différents isolats de *Staphylococcus aureus* et de *Bacillus cereus*. Afin de mettre en évidence l'effet antibactérien des extraits étudiés in vitro, nous avons choisi la méthode des puits sur milieu de Mueller-Hinton gélosé.

5.1. Principe

La méthode de diffusion très utilisée en microbiologie (antibiogramme), repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu solide. L'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition, la souche étudiée sera qualifiée de sensible, intermédiaire ou résistante. Dans la technique de diffusion

il y a compétition entre la croissance du microorganisme et la diffusion du produit à tester (**Broadasky et al., 1976**).

5.2. Protocole expérimental

Le support microbien est composé de 10 souches, dont 5 souches appartenant au genre *Staphylococcus* (SVLY3), (SPTS2R), (SFMG5BP), (SLGM1), (SSEM4), et 5 souches de *Bacillus* (BFMG16), (BLP2), (BPTS1), (BRIS3), (BCSV1). Isolées à partir des denrées alimentaires.

5.3. Repiquage des espèces bactériennes et préparation d'inoculum

Les souches bactériennes ont été enrichies dans un bouillon nutritif à 37°C pendant 24 heures. Puis un aliquot de chaque suspension bactérienne a été ensemencé en strie dans des boîtes de Pétri préalablement coulées de gélose nutritive. Après l'incubation, deux ou trois colonies, bien isolées, ont été prélevées et mise en culture dans 10ml de bouillon nutritif. Après 18 heures d'incubation à 37°C, nous avons effectué des dilutions de la suspension afin de standardiser l'inoculum. Ce dernier doit être ajusté à une densité optique entre 0,08-0,1 à 600nm soit environ 10⁸ UFC/ml.

5.4. Préparation des solutions

Une série de différentes concentrations de 1, 5 et 10mg/ ml a été préparée dans de l'eau distillée stérile à partir de chaque extrait de plante.

5.5. Ensemencement

Des boîtes de pétri contenant le milieu Mueller Hinton, ont été ensemencées par un volume de 50µl de chaque suspension bactérienne, dont la densité optique a été ajustée à 0,08-0,1 à 600 nm pour toutes les souches bactériennes testées, l'ensemencement s'effectue par étalement à l'aide d'un râteau stérile de telle sorte à assurer une distribution homogène des bactéries. Sur la surface du milieu gélosé inoculée préalablement par les différentes souches testées, nous avons réalisé des puits de 6mm de diamètre, ensuite, un volume de 80 µl de chaque concentration des deux extraits de plante a été filtré à l'intérieur des puits. Un puit contenant de l'eau distillée stérile a été utilisé comme témoin négatif. Un antibiotique est utilisé comme témoin positif. Chaque essai a été répété trois fois. Les boîtes ont été incubées à 30 C° pendant 24 heures. Après l'incubation, la lecture de l'activité antibactérienne se fait par la mesure du diamètre des zones d'inhibition autour du puit exprimée en mm.



*Résultats et
discussion*

1. Teneur des polyphénols totaux

Les polyphénols totaux ont été déterminés par la méthode de Folin-Ciocalteu. La spectrophotométrie a permis de quantifier le taux des polyphénols présents dans les extraits préparés à partir des deux plantes *Thymus capitatus* et *Artemisia herba alba*.

La courbe d'étalonnage établie à l'aide de différentes concentrations de l'acide gallique 10µL, 25µL, 50µL, 100µL, 150µL, 200µL à partir d'une solution mère à 2mg/ml, nous a permis d'estimer la teneur en composés phénoliques de chacun des deux extraits *Artemisia herba alba* et *Thymus capitatus*. Cette teneur a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage et exprimée en mg équivalent acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g d'extrait).

L'étude quantitative des extraits bruts d'*Artemisia herba alba* et *Thymus capitatus*, au moyen des dosages spectrophotométriques, avait pour objectif la détermination de la teneur des polyphénols totaux, et de flavonoïdes. Comme le montre l'histogramme présenté dans la figure (8), la teneur en polyphénols totaux contenue dans les extraits *Artemisia herba alba* et *Thymus capitatus* est variable, et elle se diffère d'un extrait à un autre.

L'extrait d'*Artemisia herba alba* a présenté la plus grande teneur en composés phénoliques (161,64mg /ml). Alors que l'extrait de *thymus capitatus* renferme moins de polyphénols que *Artemisia herba alba* avec une teneur de 131,48mg /ml.

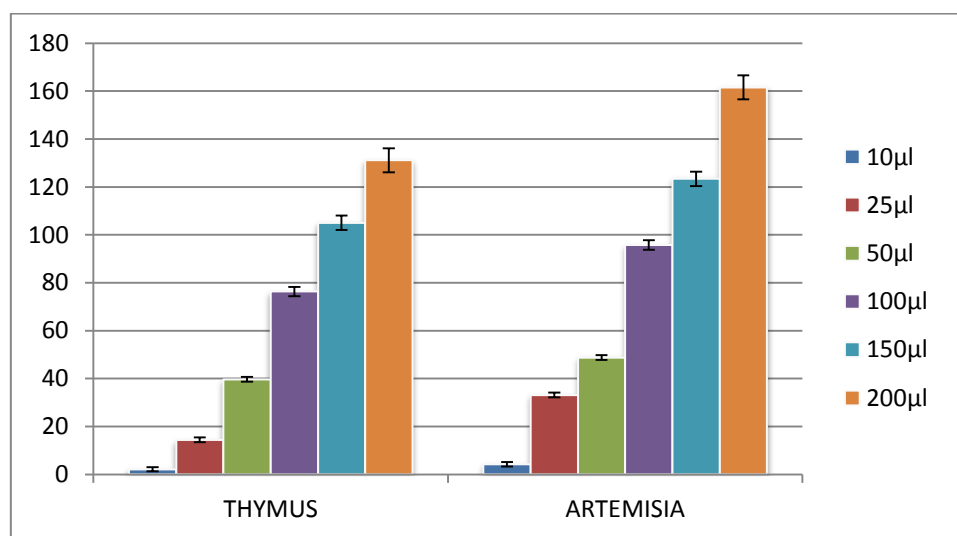


Figure 8 : Histogramme représentant les quantités des polyphénols totaux des différents extraits.

Les polyphénols produits par les végétaux en tant que métabolites secondaires constituent une large gamme de molécules chimiques, dont leur nature chimique et la teneur sont extrêmement variables d'une espèce à une autre. Plusieurs méthodes analytiques peuvent être utilisées pour la quantification des polyphénols totaux, comme la méthode de bleu de Prusse (**Graham, 1992**), mais l'analyse par le réactif de Folin Ciocalteu est la plus utilisée. (**Portes, 2008**). Ce réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique

(H₃PMO₁₂O₄₀). Il est réduit par les phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (**Boizot et Charpentier, 2006**).

En présence des polyphénols, le complexe Folin-Ciocalteu change sa couleur du jaune au bleu, ce qui permet de mesurer l'intensité de la couleur à une longueur d'onde de 765 nm (**Huang et al., 2005**).

La teneur en polyphénols totaux des extraits d'*Artemisia herba alba* sont relativement identiques à ceux trouvés par d'autres auteurs sur des plantes de la même espèce obtenus d'autres sites (Algérie et Tunisie). La quantité des composés phénoliques des extraits des plantes étudiées dépend essentiellement : de leur origine (**Ebrahimzadeh et al., 2008**), la variété, la saison de culture, la saison de récolte, les conditions climatiques et environnementales, la localisation géographique, les différentes maladies qui peuvent affecter la plante, la maturité de la plante (**Park et Cha, 2003**) et la durée de conservation.

La distribution des métabolites secondaires peut être changée pendant le développement de la plante. Ceci peut être lié aux conditions climatiques dures (la température élevée, exposition solaire, sécheresse, salinité), qui stimulent la biosynthèse des métabolites secondaires tels que les polyphénols (**Falleh et al., 2008**).

2. Teneur des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes dans les deux extraits des plantes a été estimée par la méthode utilisant le chlorure d'aluminium (AlCl₃). Cette méthode a permis de quantifier les flavonoïdes dans les extraits des deux plantes étudiées *Artemisia herba alba* et *Thymus capitatus*.

Les résultats sont représentés sur l'histogramme de la figure (9), la teneur en flavonoïdes a été exprimée en milligramme équivalent de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g d'extrait). Les résultats obtenus indiquent que la teneur en flavonoïdes est variable selon les différentes concentrations établies, et se diffère d'un extrait à un autre. Cette teneur a été estimée à (16,83mg/ml) et (14,96 mg/ml) dans les deux extraits *Artemisia herba alba* et *Thymus capitatus* respectivement. L'extrait d'*Artemisia herba alba* a représenté une teneur plus élevée en flavonoïdes par rapport à l'extrait de *T. capitatus*.

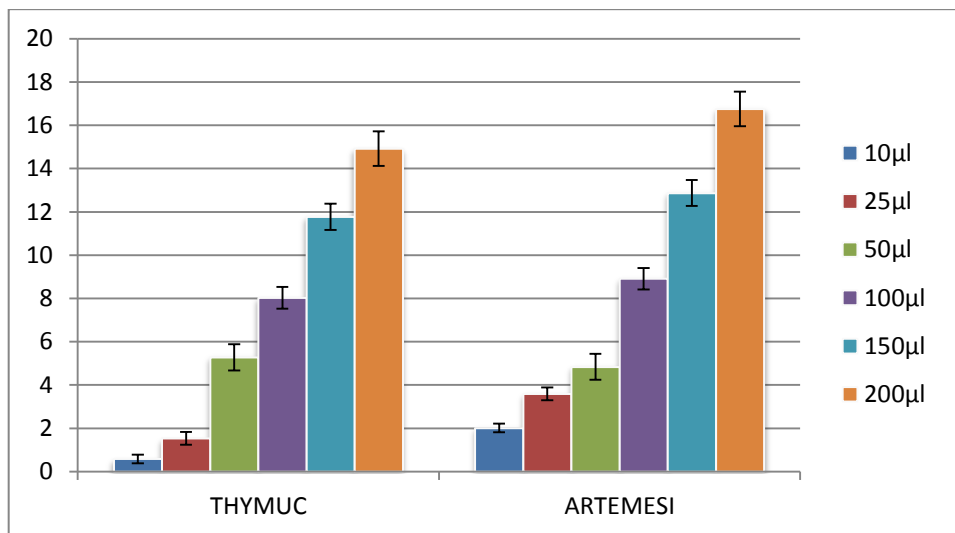


Figure 9: Histogramme représentant les quantités de flavonoïde des différents extraits.

Concernant la teneur en flavonoïdes, la raison principale pour laquelle nous avons choisi cette classe de polyphénols, réside dans le fait que les flavonoïdes constituent la classe polyphénolique la plus importante, avec plus de 5000 composés déjà décrits (**Gomez-Caravaca et al., 2006**).

Les flavonoïdes sont une classe de composés ubiquitaires dans les plantes et représentent un des plus grands groupes de produits naturels phénoliques (**Wirdel, 2003**). La teneur en flavonoïdes de l'espèce étudiée semble légèrement inférieure à celles trouvées par d'autres auteurs pour la même espèce (**Saoudi et al., 2010 ; Akrouit et al., 2011**).

3. Evaluation de l'activité antioxydante

3.1. Piégeage du radical libre DPPH

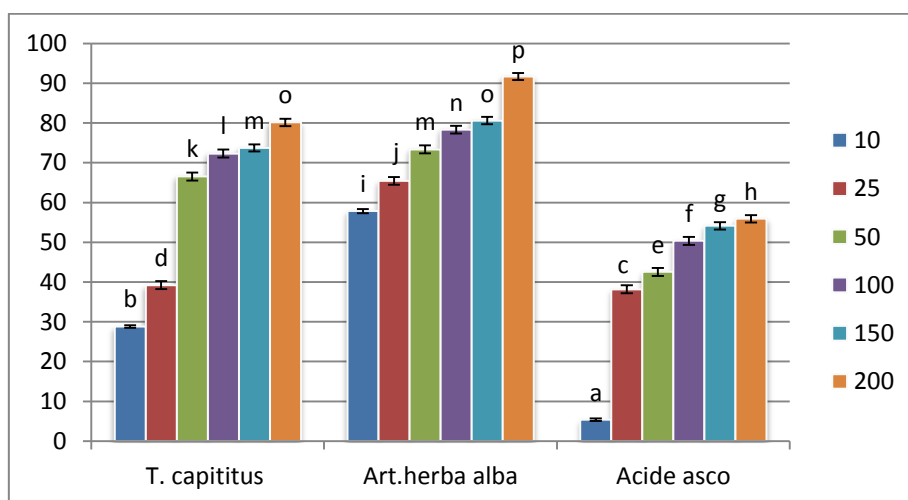


Figure 10: Le pourcentage de piégeage du radical libre DPPH.

Le pourcentage (%) de piégeage du radical libre DPPH montre la capacité de l'extrait, à une concentration fixée, de réduire ou non les radicaux libres et dans la plupart des cas, l'augmentation de la concentration de l'antioxydant amène l'augmentation de ces indices relatifs.

Les résultats obtenus de l'activité antioxydante des deux extraits de plantes étudiées sont représentés sur la figure (10 ,11). Les résultats sont exprimés en pourcentage de piégeage du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations des extraits. Nous avons constaté que le pouvoir antioxydant des extraits de plantes étudiées augmente avec l'augmentation des différentes concentrations préparées à partir d'une solution stock à 2mg/ml. En concentration 200 µL et en comparaison avec l'acide ascorbique, les deux extraits *T. capitatus* et *Artemisia herba alba* ont représenté un pourcentage d'activité antioxydante de (80,13%±0,027) et (91,65 %±0,001) respectivement, ce qui signifie que les deux extraits possèdent une activité antioxydante puissante et L'*Artemisia herba alba* a représenté une activité antioxydante élevée par rapport à *Thymus capitatus*. Le tableau (5) représente les valeurs d'IC50 des extraits étudiés.

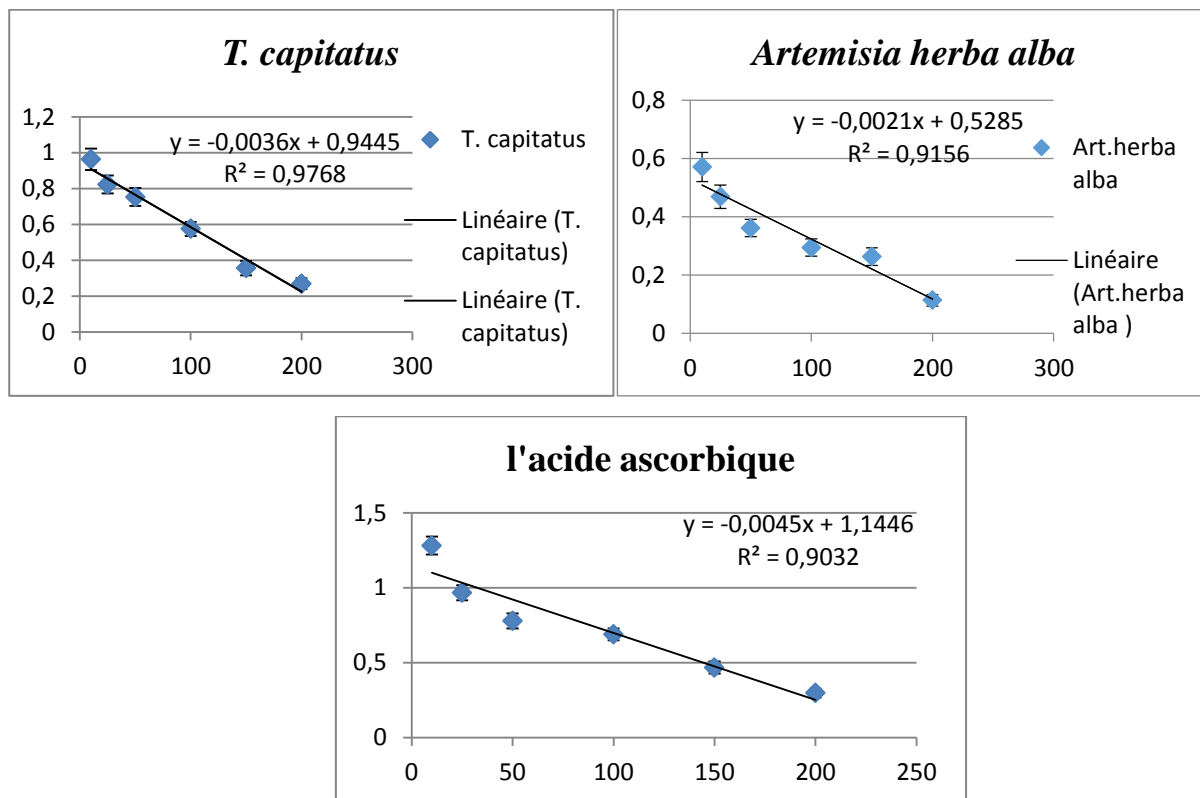


Figure 11: Variation du pouvoir antioxydant de l'acide ascorbique et des deux extraits de plante.

Tableau 4: Valeurs des IC50 des deux extraits de plante *Artemisia herba alba*, *T. capitatus* et l'acide ascorbique

Extrait	<i>T. capitatus</i>	<i>Art. herba alba</i>	l'acide ascorbique
IC50 (mg/ml)	13,62	2,355	12,21

D'après les résultats obtenus lors de l'activité antioxydante, nous avons révélé que tous les extraits étudiés possédant un pouvoir antioxydant important et ils sont capables de piéger le radical DPPH. Les valeurs des IC50 se diffèrent d'un extrait à un autre, et l'extrait *Artemisia herba alba* a représenté le pouvoir antiradicalaire le plus élevé (IC50 :2,35mg/ml), par rapport à l'extrait *T. capitatus* avec une valeur d'IC50 de 13,62mg/ml et l'acide ascorbique (12, 21mg/ml).

Le radical libre DPPH a permis l'estimation de l'activité antioxydante des extraits préparés, est généralement l'un des composés le plus utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radicale et la simplicité de l'analyse (**Bozin et al., 2008**). C'est un radical synthétique de couleur violette qui vire vers le jaune quand il est capté par les flavonoïdes contenus dans les extraits testés. L'intensité de la couleur jaune reflète la capacité antiradicalaire de la molécule, et dépend de la nature, la concentration et la puissance de cette molécule.

A travers la recherche bibliographique, il a été rapporté que les polyphénols sont des donateurs efficaces d'atome d'hydrogène au radical DPPH, en raison de leurs structures chimiques idéales (**Erol et al., 2010**), de très grande différence de points de vue sont notées à propos de cette corrélation. Certains travaux ont montré une bonne corrélation entre les IC50 et la teneur en polyphénols et en flavonoïdes, à l'apposé d'autre études n'ont pas établie cette corrélation (**Athamena et al., 2010 ; Mariod et al.,2010**). Par ailleurs, il est bien établi que l'activité antioxydante est corrélée positivement avec la structure des polyphénols. Généralement, les polyphénols avec un nombre élevé du groupements hydroxyyles présentent l'activité antioxydante la plus élevée (**Heim, et al., 2002**) due à leur pouvoir de donner plus d'atomes pour stabiliser les radicaux libres (**Torres de pinedo et al., 2007**).

La valeur d'IC50 est inversement liée à la capacité antioxydante d'un composé, comme elle exprime la quantité de l'antioxydant nécessaire pour diminuer 50% de la concentration du radical. Plus l'IC50 est faible plus l'activité antioxydante d'un composé est élevée (**Villaño et al., 2007**).

3.2. Méthode de la réduction de fer (FRAP)

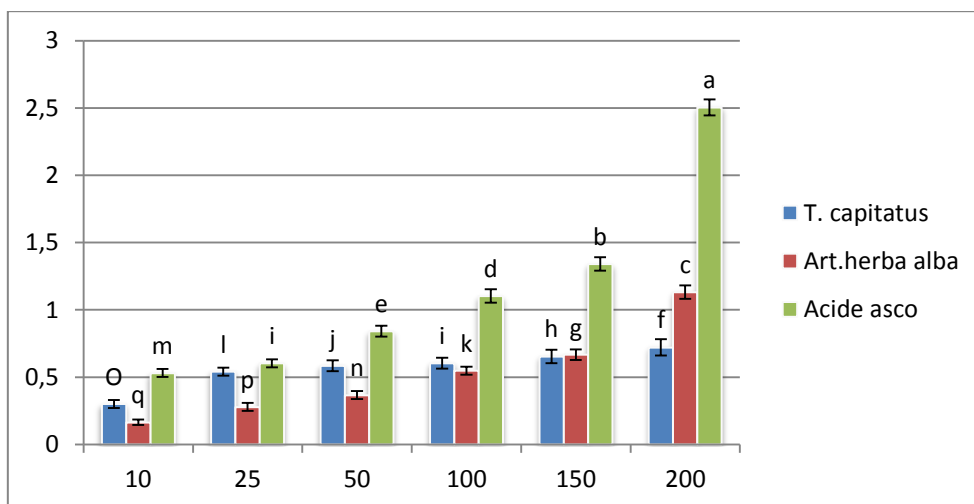


Figure 12: Pouvoir réducteur des deux extraits *T. capitatus* et *Artemisia herba alba* et d'acide ascorbique.

L'activité antioxydante des extraits de plantes étudiées a été évaluée en utilisant la méthode de FRAP. Cette méthode est basée sur la capacité des polyphénols à réduire le fer ferrique Fe^{+3} en fer ferreux Fe^{+2} . Dans notre travail nous avons opté pour tester les deux extraits. L'acide ascorbique (AA) a été utilisé comme antioxydant de référence.

Les résultats obtenus (Figure 12) ont montré que l'augmentation de la réduction du fer est proportionnelle avec l'augmentation de la concentration (de 10 μ L à 200 μ L) de l'acide ascorbique et des deux extraits de plantes *Artemisia herba alba* et *T. capitatus*. L'extrait d'*Artemisia herba alba* a représenté un pouvoir réducteur élevé (DO de 0,16 jusqu'à 1,13 à 700nm) par rapport à *T. capitatus* avec des valeurs de densité optique (DO) allant de 0,30 jusqu'à 0,72. De ce fait, nous pouvons dire que les extraits de *T. capitatus* et *Artemisia herba alba* ont représenté une activité antioxydante très intéressante suivant les résultats obtenues par la technique FRAP.

En tant que bons donneurs d'électrons, ce type de composés montre la capacité réductrice sur la réduction de Fe^{+3} en Fe^{+2} . Ainsi, les extraits de *T. capitatus* et *Art. herba alba* qui contient une quantité notable de polyphénols et de flavonoïdes peuvent jouer un rôle majeur dans l'inhibition d'oxydation. Les résultats de cette étude ont indiqué que ces plantes peuvent être utilisées comme source naturelle d'antioxydants, facilement accessible.

Le pouvoir réducteur des deux extraits est dû à la présence du lycopène et de groupement hydroxyle dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneur d'électron. Par conséquent, les antioxydants peuvent être considérés comme des réducteur et inhibiteur des oxydants. (Siddhuraju et Becker, 2007). Quelques études antérieures ont également montré que le pouvoir réducteur d'un composé peut servir comme indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle (Jeong *et al.*, 2004).

Les extraits bruts sont plus actifs, cela est due surement à la complexité de ces extraits en substance polyphénoliques et la synergie entre eux pour une meilleure activité antioxydante (Vermerris et Nicholson, 2006).

L'efficacité de l'antioxydant (AH) augmente si la force de la liaison A-H est faible et le radical (A) résultant doit être le plus stable possible, ce qui est le cas pour les composés phénoliques et flavonoïdes, ce sont des meilleurs donneurs d'électron ou d'hydrogène (Shaidi et Naczki, 2004). Plusieurs études ont montré que les groupements hydroxyles dans les composés phénoliques et flavonoïdes sont responsables de leur pouvoir antioxydant (Heim et al, 2002).

4. Activité antibactérienne des extraits de plante *Artemisia herba alba* et *Thymus capitatus*

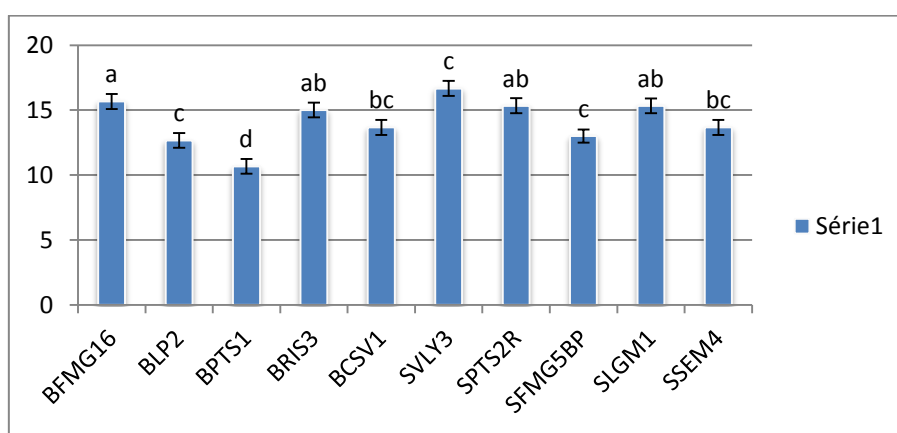


Figure 13: Activité antibactérienne d'extrait méthanolique de *Thymus capitatus*.

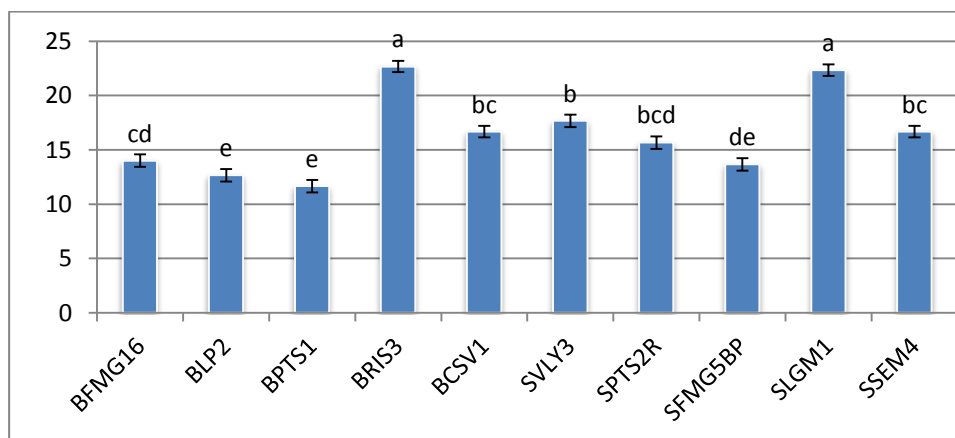


Figure 14: Activité antibactérienne d'extrait méthanolique d'*Artemisia herba alba*.

Les résultats présentés dans la figure (13,14), montrent que le pouvoir antibactérien se diffère d'une souche à une autre, sachant que les mêmes concentrations des extraits ont été appliquée pour les dix (10) souches testées. Nous avons constaté que l'inhibition de la croissance bactérienne dépend de deux facteurs : la bactérie utilisée et la nature et la concentration du produit testé. Les deux plantes n'ont pas les mêmes effets sur les souches bactériennes testées. D'après les résultats obtenus nous avons constaté que l'extrait de l'*Artemisia herba alba* et en comparaison à

Thymus capitatus a été plus efficace sur la croissance bactérienne des deux espèces bactériennes étudiées.

Les zones d'inhibition augmentent considérablement avec l'augmentation des différentes concentrations des deux extraits de plantes de *Thymus capitatus* et d'*Artemisia herba-alba*, les deux souches BFMG16 et SVLY3 ont représenté une sensibilité élevée vis-à-vis les différentes concentrations du *Thymus capitatus* avec des zones d'inhibition de 15,66mm et 16,66 mm, respectivement. Tandis que les deux souches BRIS3 et SLGM1 ont montré des zones d'inhibition de 22,66mm et 22,33mm, respectivement en présence de différentes concentrations d' *d'Artemisia herba-alba*. Toutes les souches testées de *Bacillus cereus* et de *Staphylococcus aureus* ont été plus sensibles à des fortes concentrations des extraits. Les souches de *Staphylococcus aureus* étudiées ont été plus résistantes vis-à-vis les deux extraits *Thymus capitatus* et *Artemisia herba-alba* avec des zones d'inhibition de (13mm à 22,33mm), alors que les souches de *Bacillus cereus* ont représentés des zones d'inhibition de 10,66 mm à 22,66 mm.

L'extrait méthanolique d'*Artemisia herba-alba* a représenté l'effet antibactérien le plus important avec des zones d'inhibition allant jusqu'à 22,66mm.

Les plantes contiennent de nombreux composés doués d'une action antimicrobienne, ces constituants comprennent les composés phénoliques, les flavonoïdes, les huiles essentielles et les triterpénoïdes (Rojas *et al.*, 1992), le pouvoir antimicrobien des extraits de plantes est tributaire de leurs compositions chimiques.

Il a été rapporté que l'activité antimicrobienne chez d'autres plantes est dû à la présence d'anthraquinones (Comini *et al.*, 2011; Doughari *et al.*, 2012).

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

Les résultats présentés dans les figures (17,18,19,20,21) précédentes ont montré que la formation de biofilm diminue avec l'augmentation de la concentration des extraits méthanoliques de *Thymus capitatus* et d'*Artemisia herba-alba*, sauf pour les souches BFMG16, BPTS1 et SVLY3, SSEM4 que la formations du biofilm a augmenté en présence des deux extraits étudiés, ce qui explique que ces deux souches sont résistantes à nos extraits testés. Les deux plantes n'ont pas les mêmes effets sur les souches bactériennes.

L'effet antibiofilm de l'extrait méthanolique d'*Artemisia herba-alba* a été plus élevé sur les deux espèces bactériennes que l'extrait de *Thymus capitatus*. Nous avons testé par la méthode de

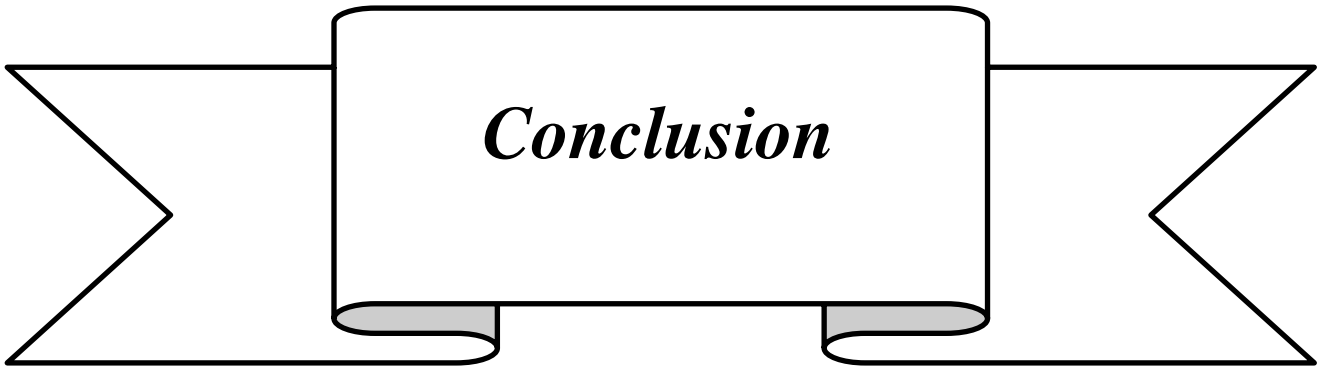
cristal violet la capacité des dix (10) différentes souches de notre cohorte appartenant aux genres *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* à former in vitro les biofilms bactériens en présence des extraits de *Thymus capitatus* et *L'Artemisia herba-alba*. Pour l'inhibition de la formation de biofilm de la plupart des souches bactériennes testées a été faibles dans le cas de la concentration (0,5 mg /ml) et pour les souches *Bacillus cereus*, le pourcentage d'inhibition obtenu pour l'extrait *Thymus capitatus* a été de 7,19 jusqu'à 22,48 %, concernant *l'Artemisia herba-alba* a été de 23,41 jusqu'à 40,10 %. Le pourcentage d'inhibition de la formation de biofilm obtenu par l'extrait de la plante *Thymus capitatus* contre la croissance du *Staphylococcus aureus* est de 10,20% jusqu'à 56,75 %, pour l'extrait d'*Artemisia herba-alba* les valeurs obtenues sont de 1,13% jusqu' à 34,59 %. A des concentrations élevées (2 mg /ml), le pourcentage d'inhibition de la formation de biofilm a été élevé, pour l'extrait *Thymus capitatus* 26,02% jusqu'à 50,33%, alors que *l'Artemisia herba-alba* a donné un pourcentage d'inhibition de 38,82% jusqu'à 59,42% vis-à-vis des différents isolats de *Bacillus cereus*. Concernant les souches de *Staphylococcus aureus* ont été moins sensibles aux différentes concentrations des deux extraits méthanoliques testés. Le pourcentage d'inhibition obtenue par l'extrait de la plante *Thymus capitatus* est de 21,12% jusqu'à 67,07 %, pour l'extrait d'*Artemisia herba-alba* les valeurs obtenues sont de 13,59 % jusqu'à 47,53 %.

Tous ces résultats ont montré que le pourcentage d'inhibition de la formation du biofilm par les deux extraits des plantes étudiées, augmente avec l'augmentation de la concentration de l'extrait méthanolique de chaque plante, L'extrait d'*Artemisia herba-alba* a été plus efficace pour inhiber la formation des biofilms que *Thymus capitatus*.

La composition biochimique et l'architecture de la surface cellulaire (présence de protéines, de fimbriae, de flagelles, d'exopolymères, de peptidoglycane chez les bactéries à Gram positif, de lipopolysaccharides chez les bactéries à Gram négatif ou de phospho-mannoprotéines chez les levures) contribuent à l'adhésion des microorganismes aux supports. Par exemple, les fimbriae contiennent une forte proportion d'acides aminés hydrophobes, ce qui conduit à l'établissement d'interactions hydrophobes avec le matériau (**Donlan, 2002**). Les flagelles permettent à la bactérie d'être mobile et semblent jouer un rôle important dans les premières étapes de l'adhésion en contrecarrant les forces de répulsion électrostatique (**Pratt et Kolter, 1998**).

Des protéines de surface, fréquemment appelées « adhésines », sont également fortement impliquées dans l'adhésion aux supports (**Flint et al., 1997**), Ainsi, Cucarella et ses collaborateurs (2001) ont identifié chez *S. aureus* une protéine de paroi appelée BAP (« Biofilm Associated Protein »).

A des concentrations faibles 25µl et pour l'enzyme protéinase K, nous avons observé une faible diminution de la croissance bactérienne allons de 1, 87 jusqu'à 1, 23 pour *Bacillus cereus* et de 1,52 jusqu'à 1,23 pour *Staphylococcus aureus*, cette inhibition a été augmentée avec les différentes concentrations. La concentration 200µl a été la dose la plus efficace contre la croissance de différents isolats avec des valeurs de DO allant de 0, 92 jusqu'à 0, 32 pour les souches de *Bacillus cereus* et de 0, 76 jusqu'à 0, 50 pour les souches de *Staphylococcus aureus* avec une diminution du pH de 8 jusqu'à 5. Les deux souches BLP2 et SFMG5BP ont été plus résistantes vis-à-vis du traitement enzymatique effectué par les deux enzymes en comparaison avec les autres souches.



Conclusion

Conclusion

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

Dans le présent travail, différents aspects d'*Artemisia herba alba* et *Thymus capitatus* ont été étudiés : teneur en polyphénols totaux, pouvoir antioxydant, activité antimicrobienne et antibiofilm des extraits bruts.

La caractérisation quantitative des extraits méthanoliques a été faite pour déterminer leurs contenu en polyphénols et en flavonoïdes. Nous avons trouvé que les deux extraits *Artemisia herba alba* et *Thymus capitatus* ont représentés des teneurs en polyphénols de l'ordre de (161,64 mg/ml) et (131,48 mg/ml), respectivement. Les teneurs en flavonoïdes sont de (16,83mg/ml) et (14,96 mg/ml). Ces résultats indiquent que le contenu en flavonoïdes est faible par rapport à celui des polyphénols pour les deux extraits étudiés. L'extrait *Artemisia herba alba* s'est révélé le plus riche en polyphénols et en flavonoïdes par rapport à l'extrait *Thymus capitatus*.

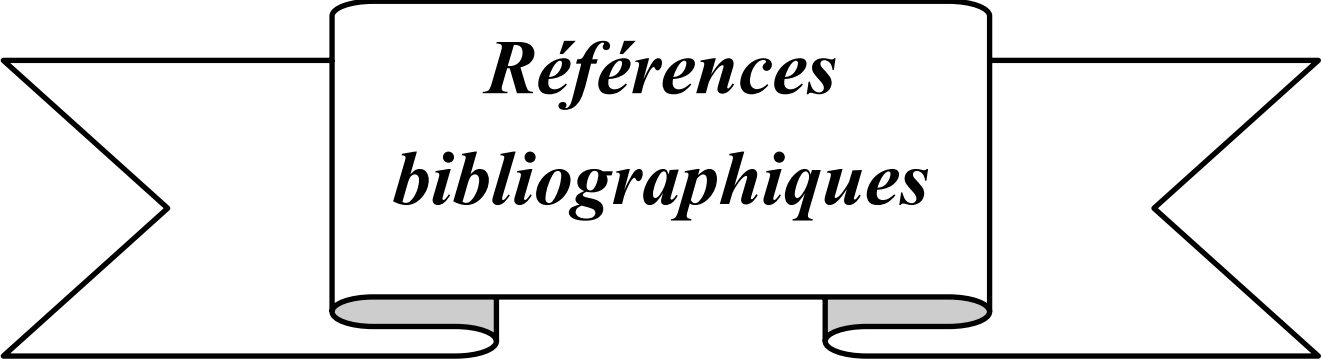
Deux méthodes chimiques comparatives sont utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante, la méthode DPPH et la méthode FRAP:

La méthode chimique consiste à utiliser le test DPPH, qui est basée sur la réduction du radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle, cette méthode est indépendante de la polarité du substrat. Les résultats obtenus montrent que les fractions méthanoliques renferment de puissants composés actifs capables de réduire ce radical libre, puisqu'ils agissent à des faibles concentrations. Les valeurs d'IC₅₀ sont représentés extrêmement diverses. L'extrait *Artemisia herba alba* présente le pouvoir antiradicalaire le plus élevé (2,35mg/ml), par rapport à l'extrait *T. capitatus* (13,62mg/ml).

Aussi, l'activité antioxydante a été évaluée par la technique de réduction du fer FRAP, qui représente un indicateur significatif du pouvoir antioxydant des plantes. Les résultats montrent que la capacité réductrice de l'extrait *Artemisia herba alba* (1,131±0,001 mg/ml) a été plus élevée que l'extrait *Thymus capitatus* (0,721±0,001 mg/ml).

L'activité antimicrobienne a été déterminée sur dix souches bactériennes, selon la méthode des puits, les résultats indiquent que les deux extraits possèdent une activité antimicrobienne sur toutes les souches testées. La plante d'*Artemisia herba-alba* a représenté l'effet antimicrobien le plus important avec des zones d'inhibition allant jusqu'à 22 ,66 mm.

Cependant, la formation d'un biofilm permet à des bactéries pathogènes à coloniser une grande variété de niches d'accueil et de persister dans des environnements difficiles, ce qui rend leur élimination particulièrement difficile. De nouvelles stratégies, conçues pour la dispersion et l'inhibition de biofilm sont rapportés. La caractérisation des composés phénoliques des différents extraits par HPLC est recommandée pour mieux comprendre le mécanisme d'action des composés antioxydants.



***Références
bibliographiques***

- Agata, N., Ohta M., Yokoyama, K. (2002).** Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various foods. *International Journal of Food Microbiology*. 73, 23-27.
- Ahmed, A.A., Abou-El-Ela, M., Jakupovic, J., Seif El-Din, A.A., Sabrit, N. (1990).** Eudesmanolides and other constituents from *Artemisia herba-alba*. *Phytochemistry*. 29, 3661 - 3663.
- Akroum, S. (2010).** Etude Analytique et Biologique des Flavonoïdes Naturels. Thèse de Doctorat : Université MENTOURI de CONSTANTINE-ALGERIE.180.
- Akroum, A., Gonzalez, L.A., El Jani, H.J., and Madrid, P.C. (2011).** Antioxidant and antitumor activities of *Artemisia campestris* and *Thym elaeahirsuta* from southern of Tunisia. *J. Food. Chem. Tox.* 49, 342–347.
- Ameenah, G. F. (2006).** Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*. 27, 1-93.
- Andersson, A., Rönner, U. & Granum, P. E. (1995).** What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? *International Journal of Food Microbiology*. 28, 145-155.
- Athamena, S., Chalghem, I., Kassah-Laouar, A., Laroui, S., khebri, S. (2010).** Activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits *CUMINUM CYMINUM L.* *Lebanese Science journal*.11(1), 69-81.
- Atoui, A.K., Mansouri, A., Boskou, G., Kefalas, P. (2005).** Tea and herbal infusions : Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chem.* 89 ,27-36.
- Baggett, H.C., Hennessy, T.W., Rudolph, K., et al (2004).** Community-onset methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with antibiotic use and the cytotoxin Pantone-Valentine leukocidin during a furunculosis outbreak in rural Alaska. *J Infect Dis*.189, 1565-1573.
- Baier, R. E. (1980).** Substrata influences on adhesion of microorganisms and their resultant new surface properties. In: G. Bitton and K.C. Marshall. Adsorption of microorganisms to surfaces. John Wiley, New York, 59-104.
- Barham, D., and Trinder, P. (1972).** Estimation of glucose. *Analyst*. 97,142.
- Bauer, W. J., Badoud, R., Lölliger, J. & Etournaud, A. (2010).** Science et technologie des aliments: Principes de chimie des constituants et de technologie des procédés. *Edition PPUR Presses polytechniques*, 212.

- Beckloff, N., Laube, D., Castro, T., Furgang, D., Park, S., Perlin, D., Clements, D., Tang, H., Scott, R. W., Tew, G. N., et Diamond, G. (2007).** Activity of an antimicrobial peptide mimetic against planktonic and biofilm cultures of oral pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.51 (11): 4125- 4132.
- Bénard, C. (2009).** Etude de l'impact de la nutrition azotée et des conditions de culture sur le contenu en polyphénols chez la tomate. Thèse de Doctorat : Université de NANCY.
- Bismuth, R., Jarlier, V., Nicolas, M.H et Grosset, J. (1984).** Etat actuel des phénotypes de résistance aux antibiotiques de *Staphylococcus aureus* In : Vachon, F et Regnier, B. Les infections à *staphylocoques meticilline* résistants. Paris : Arnettes. 51-66.
- Boles, B.R., & Horswill, A.R. (2008).** agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. PLoS Pathog 4: e1000052. Yarwood, J.M., Bartels, D.J., Volper, E.M., & Greenberg E.P (2004). Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Bacteriol* .18,1838–1850.
- Boizot, N., and Charpentier,J.P. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre foustier. *Le cahier des techniques de l'Inra*.79-82.
- Bonnet, C., Alamigeon, F. & Micheels, P. (2010).** Guide complet des soins esthétiques : du côté de ma vie. *Edition Eyrolles*. 14.
- Boriky, D., Berrada, M., Talbi , M., Keravis , G., Rouessac , F .(1996).** Eudesmanolides from *Artemisia herba-alba*. *Phytochemistry* .43 ,309 - 311.
- Bougandoura, N., Bendimerad, N. (2012).** Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* ssp.Nepeta (L.) Briq Rev. « Nature & Technologie ». B- Sciences Agronomiques et Biologiques. 09,14-19.
- Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., Goran, A., Igc, R. (2008).** Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., *Alliaceae*), *Food Chemistry*.111, 925-929.
- Bruneton, J. (1999).** Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales. *Edition Technique et documentation*, 233.
- Broadsky, T. F., Lewis, C., Eble, T.E. (1976).** Bioautographic thin layer chromatographic analysis of antibiotics and their metabolites in the whole animal. I Clindamycin in the rat.*J. Chromatogr.* 123, 33-44.
- Buckingham, S.C., McDougal LK, Cathey LD, et al (2004).** Emergence of community associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a Mem &phis, Tennessee Children's Hospital. *Pediatr Infect Dis J*.23, 619-624.

- Canillac, N., and Mourey, A. (2001).** Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. *Food Microbiology* .18, 261-268.
- Cano, N., Barnoud, D., Schneider, S. M., Vasson, M.-P., Hasselmann, M. & Leverve, X. (2006).** Traité de nutrition artificielle de l'adulte. *Edition Springer*, 255.
- Carr, A., Frei, B. (1999).** Does vitamin C act as pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB J.* 13(9), 1007-1024.
- Causse, C. (2005).** Les secrets de santé des antioxydants : C'est naturel, c'est ma santé. *Alpen éditions s.a.m.*, p 30.
- Césarini, J.-P. (2004).** Le sélénium : actualités. *John Libbey Eurotext Edition*, p 14.
- Chaignon, P., Sadovskaya, I., Ragunah, C., Ramasubbu, N., Kaplan, J., & Jabbouri, S. (2007).** Susceptibility of staphylococcal biofilms to enzymatic treatments depends on their chemical composition. *Appl Microbiol Biotechnol.*75, 125–132.
- Chanforan, C. (2010).** Stabilité de microconstituants de la tomate (composés phénoliques, caroténoïdes, vitamines C et E) au cours des procédés de transformation : études en systèmes modèles, mise au point d'un modèle stoechio-cinétique et validation pour l'étape unitaire de préparation de sauce tomate. Thèse de Doctorat : Université D'AVIGNON et des PAYS de VAUCLUSE.
- Characklis, W. G., Marshall , K. C. (1990).** Biofilms. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y.
- Cheyrier, V. (2005).** Polyphenols in foods are more complex than often thought1–3. *Am. J. Clin. Nutr.*81 (suppl), 223S-229S.
- Christophe, P., & Christophe S. (2011).** Physiologie, pathologie et thérapie de la reproduction chez l'humain. *Edition Springer.*84.
- Chun, H., Shin, D.H., Hong, B.S., Cho, H.Y., Yang, H.C. (2001).** Purification and biological activity of acidic polysaccharide from leaves of *Thymus vulgaris L.* *Biol Pharm Bull* .24(8), 941-946.
- Coghlan, A. (1996).** Slime city. *New Sci.* 2045, 32-36.
- Collado, J., Fernández, A., Rodrigo, M., Camats, J. & Lopez, A. M. (2003).** Kinetics of activation of *Bacillus cereus* spores. *Food Microbiology* .20, 545-548.
- Comini, M.A, Medeiros, A.M .,& Manta, B. (2011)** .Stress response in the infective stage of *Trypanosoma brucei*. In: Stress response in microbiology. Ed. José M. Requena. Horizon Scientific Press, Norwich, UK. *In press*.
- Costerton, J.W., Geesey , G.G., Cheng ,G.K.(1978)** . How bacteria stick. *Sci. Am.* 238, 86-95.

- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., De Beer, D., Caldwell, D., Korber, D., James, G. (1994).** Minireview: biofilms, the customized microniche. *J. Bacteriol.* 176, 2137-2142.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., Lappin-Scott H.M. (1995).** Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 711-745.
- Dai, J. & Mumper, R. J. (2010).** Plant Phenolics : Extraction, Analysis and Their Antioxydant and Anticancer Propreties. *Molecules* .15(10), 7313-52.**Da Silva, J. A. (2004)** .Mining the essentil olis of the Anthemideae .African Jornal of Biotechnenology December.706 -720.
- Daniel G., Chamberlain A., Jones E., (1987).** Cytochemical and electron microscopical observations of the adhesive materials of marine fouling diatoms. *British phycological journal.* 22, 101-118.
- D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R. Giovannini, C. & Masella, R. (2007).** Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann. Ist. Super Sanità* .43(4) 348-361.
- De La Rosa, L. A., Alvarez-Parrilla, E., & Gonzalez-Aguilar, G. A. (2009).** Fruit and vegetable phytochemicals : Chemistry, Nutritional value and stability. *Edition John Wiley and Sons*, p 73.
- De Robertis, E. D. P., & De Robertis, E. M. F. (1983).** Biologie cellulaire et moléculaire. *Presses Université Laval*, 287.
- Descheemaeker, K. (2003).** Nutri-et Phytotherapie : Developpements Recents. *Edition Garant*, p 12, 46.
- Deyama, Y., Matta, M., Yoshimura, et al .(2006).** Moecular characterization of the zincfinger transcription fact or osterix .*Int. J.Mol-Med.* 17 ,425-430.
- Dicko, M. H., Gruppen, H., Traoré, A. S., Voragen, A. G. J., & Van Berkel, W. J. H. (2006).** Phenolic compounds and related enzymes as determinants of sorghum for food use. *Biotechnology and Molecular Biology Review.* 1 (1), 21-38.
- Donlan, R.M., Costerton, J.W. (2002).** Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 167-193.
- Doughari, J.H., Ndakidemi, P.A., Human, I.S., Benade, S. (2012).** Virulence, resistance genes and transformation amongst environmental isolates of Escherichia coli and Acinetobacter spp, *J. Microbiol. Biotech.* 22(1), 25-33.
- Doyle, E. (2002).** Survival and Growth of Clostridium perfringens During the Cooling Step of Thermal Processing of Meat Products. Food Research Institute, University of Wisconsin, Madison, USA. 1–15.
- Dugas, A. J., Castaneda-Acosta, J., Bonin, G.C., Price, K.H., Fisches, N.H., et Winston, G.W. (2000).** Evaluation of the total peroxy radical scavenging capacity of flavonoids: structure activity relationships. *Journal of Natural product.* 63, 31-327

- Duraffourd, C ., Lapraz, J.C., Chemil, R., (1997)** .La plante médicinale de la tradition à la science .1^{er} congrès Intercontinental.Tunis .Ed .Granche.paris. 222 .
- Ebrahimzadeh, M.A., Hosseinimehr, S.J., Hamidinia, A., Jafari, M. (2008a)**. Antioxidant and free radical scavenging activity of Feijoa sellowiana fruits peel and leaves. *Pharmacologyonline*. 1, 7-14.
- Eddouks, M., Ouahidi, M.L., Farid, O., Moufid, A., Khalidi, A., Lemhadri, A. (2007)**. L'utilisation des plantes médicinales dans le traitement du diabète au Maroc. *Phytothérapie*. 5, 194 -203.
- Eidi, A., Eidi, M., Darzi, R. (2009)**. Antidiabetic effect of *Olea europaea* L. in normal and diabetic rats. *Phytother Research*. 23,347–50.
- El kouri, D., Pohier, M.A., Trewick, Gallou , F., Baron, D et Potel, G. (1998)**. Infections à staphylocoques : agents cliniques et bactériologiques. *Encycl Med Chir, Maladies Infectieuses*.
- Erol, N. T., Sarı, F. & Velioglu, Y. S. (2010)**. Polyphenols, alkaloids and antioxidant activity of different grades turkish black tea. *GIDA* .35 (3), 161-168.
- Fain, O. (2004)**. Mise au point : Carences en vitamine C. *La revue de médecine interne*. 25, 872-880.
- Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdely, C. (2008)**. Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities . *C. R. Biologies*.331, 372-379.
- Feinbrun-Dothan, N. (1978)**. Flora palaestina, Part Four -Text. Israel Acad Sciences and Humanities Jerusalem.
- Flandrois, J.P. (1997)**. *Bactériologie médicale*. Presse Universitaire de Lyon.
- Flemming , H.C.(1990)**. Introduction: biofilm as a particular form of microbial life. in *Biofouling and biocorrosion in industrial water systems*. Stuttgart.
- Flemming, H.C., Wingender, J., Moritz, R., Borchard, W., Mayer, C. (1999)**. Physico-chemical properties of biofilms. Short review, *Biofilms in the aquatic environment*. Edt *The Royal Society of Chemistry*. 1-12.
- Fletcher, E. L., Weissman, B.A., Efron, N., Fleiszig, S.M., Curcio, A.J., Brennan, N.A. (1993)**. The role of pili in the attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to unworn hydrogel contact lenses. *Curr. Eye Res*. 12, 1067-1071.
- Fleurette, J. (1989)**. Staphylocoques et microcoques. In : LE MINOR L et VERON M, eds. *Bactériologie médicale*. Paris : Flammarion. 773-94.
- Flint, D. J., Woodruff, R.B., & Gardial, S.F. (1997)**. Customer Value Change in Industrial Marketing Relationships: A Call for New Strategies and Research. *Industrial Marketing Management*. 26, 163-75.

- Garcia-Ruiz, A., Bartolomé, B., Martínez-Rodríguez, A.J., Pueyo, E., Martín-Alvarez, P.J., and Moreno-Arribas, M.V. (2008).** Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine. *Food Control*. 19, 835-841.
- Gavin, R., Merino, S., Altarriba, M., Canals, R., Shaw, J.G., Tomás, J.M. (2003).** Lateral flagella are required for increased cell adherence, invasion and biofilm formation by *Aeromonas* spp. *FEMS Microbiol. Lett.* 224, 77-83.
- Ghazi, F., Sahraoui, S. (2005).** Evolution des composés phénoliques et des caroténoïdes totaux au cours de la maturation de deux variétés de dattes communes : Tantboucht et Hamraïa. Mémoire d'ingénieur. Institut national d'agronomie. Alger . p81.
- Ghedira, K. (2005).** Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytotherapie*. 3(4), 162-169.
- Ghrabi, Z., Sand, R.L. (2008).** *Artemisia herba alba* Asso. A Guide to Medicinal Plants in North Africa .49 - 49.
- Gómez-Caravaca, A. M., Gómez-Romero, M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2006).** Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 41, 1220-1234.
- Goudable, J., & Favier, A. (1997).** Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. 11,115-120.
- Graham, H.D. (1992).** Stabilisation of the Prussian blue colour in the determination of polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* 40,801-805.
- Granum, P. (1994).** *Bacillus cereus* and its toxins. *J. Appl. Bacteriol.* 76, 61- 66.
- Granum, P. E. (2001).** *Bacillus cereus* in Doyle, M. P. e. a. (Ed), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, 2nd Ed.*, ASM Press. 373-381
- Greff, M. (2011).** Post U 'FMC-HGE: Paris, du 24 au 27 mars 2011. *Springer Edition*. p 39.
- Guidot, D. M., Repine, J. E., Kitlowski, A. D., Flores, S. C., Nelson, S. K., Wright, R. M., & McCord, J. M. (1995).** Mitochondrial respiration scavenges extramitochondrial superoxide anion via a nonenzymatic mechanism. *The Journal of Clinical Investigation* .96, 1131-1136.
- Guinebretière, M. H. et al (2008).** Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. *Environmental Microbiology* .10, 851-865.
- Guinebretière, M.H., Girardin, H., Dargaignaratz, C., Carlin, F., Nguyen-The, C. (2003).** *Bacillus cereus* and spore-forming aerobic bacteria in a cooked, pasteurized and chilled zucchini puree processing line. *Int. J. Food Microbiol.* 82, 223 -232.

- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1986).** Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problem and concepts. *Arch. Biochem. Biophys.* 246, 501-514.
- Heim, K-E., Tagliaferro, A-R., Bobilya, D-J. (2002).** Flavonoid antioxidants: chemistry metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutrition and Biochemistry.* 13, 572-584.
- Hoffmann, L. (2003).** Etude du métabolisme des phénylpropanoïdes; analyse de l'interaction de la caféoyl-coenzyme A 3-O-méthyl transférase (CCoAOMT) avec son substrat et caractérisation fonctionnelle d'une nouvelle acyltransférase, l'HydroxyCinnamoyl-CoA : shikimate/quinate hydroxycinnamoyl Transférase (HCT). Thèse de Doctorat : Université de LOUIS PASTEUR-STRASBOURG I.
- Huang, D., Ou B., and Prior, R.L. (2005).** The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J of Agr Food chem.* 53, 1841-1856.
- Huang, G., Jiang, J., and Dai, D. (2008).** Antioxidative and antibacterial activity of the methanol extract of *Artemisia anomala* S. Moore. *African Journal of Biotechnol.* 7 (9), 1335-1338.
- Hubert, J. (2006).** Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja. Etude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaines, Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat à l'Institut Nationale Polytechnique de Toulouse, Ecole Doctorale des Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bio ingénieries. 160.
- Husmark, U., Ronner, U. (1990).** Forces involved in adhesion of *Bacillus cereus* spores to solid surfaces under different environmental conditions. *J Appl Bacteriol.* 69, 557-562.
- Ishida, K. T., Griffiths, P. R. (1990).** Adsorption of proteins and polysaccharides at aqueous solid interfaces by infrared internal reflection spectrometry. *Acs. Symp. Ser.* 447, 208-224.
- Ismaili, H., Sosa, S., Brkic, D., Fkih-Tetouani, S., Ildrissi, A., Touati, D., Aquino, R., Tubaro, A. (2002).** Topical anti-inflammatory activity of extracts and compounds from *Thymus broussonettii*. *J Pharma Pharmacol.* 54, 1137-1140.
- Jacob, L. (2007).** L'insuffisance rénale aiguë. *Edition Springer.* p 88.
- Juneja, V.K., Novak, J.S., Huang, L., Eblen, B.S. (2003).** Increased thermotolerance of *Clostridium perfringens* spores following sublethal heat shock. *Food Control.* 14, 163-168.
- Jürgen, R., Paul, S., Ulrike, S., and Reinhard S. (2009).** Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial, Antifungal, Antiviral, and Cytotoxic Properties— an Overview: *Forsch Komplementmed.* 16, 79-90.

- Kabouche, A., Kabouche, Z., Seguin, E., Tillequin, F., and Bruneau, C. (2005).** A phenylethanoid glycoside and flavonoids from *Phlomis crinita* (Cav.) Lamiaceae. *Biochem. Syst. & Ecol.* 33, 813-816.
- Katsikogianni, M., Missirlis, Y.F., Harris, L., Douglas, J. (2004).** Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *Eur. Cell. Mater.* 8, 37-57.
- Kempf, L., Zeitouni, S. (2009).** Coût biologique de la résistance aux antibiotiques: analyse et conséquences Pathologie Biologie. 6, 28-52.
- Khalil zadeh Pouneh. (2009).** Formation de Biofilm à *Pseudomonas aeruginosa* :évaluation d'inhibiteurs potentiels du Quorum Sensing . Thèse présenté à L'Université Paul Sabatier Toulouse III.
- Klausen, M., Gjermansen, M., Kreft, J.U., Tolker-Nielsen, T. (2006).** Dynamics of development and dispersal in sessile microbial communities: examples from *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* model biofilm. *FEMS Microbiol. Lett.* 261, 1-11.
- Kotiranta, A., Lounatmaa, K., & Haapasalo, M. (2000).** Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes Infect.* 2, 189-198.
- Kramer, J.M., Gilbert, J.M. (1989).** *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. Ch. 2. In: Doyle, M.P. (Ed.), *Foodborne Bacterial Pathogens*. Marcel Dekker, New York, pp. 21-70.
- Kuchma, S. L., Connolly, J. P., O'Toole, G. A. (2005).** A three-component regulatory system regulates biofilm maturation and type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 187, 1441-1454.
- Kundan ,S.B., Anupam, S. (2011).** The Genus *Artemisia*: A Comprehensive Review. *Pharmaceutical Biology.* 49 (1), 101-109.
- Lapidus, A. et al(2008).** Extending the *Bacillus cereus* group genomics to putative food-borne pathogens of different toxicity. *Chemico-Biological Interactions.* 171, 236-249.
- Lee, C. Y., Sharma, A., Cheong, J. E., & Nelson, J. L. (2009).** Synthesis and antioxidant properties of dendritic polyphenols. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 19, 6326-6330.
- Le Floc'h, E. (1983).** Contribution à une étude ethnobotanique de la flore tunisienne. Programme Flore et Végétation tunisienne. Min. de l'En. Sup. et de la Rech. Sci. 387.
- Leroy, C. (2006).** Lutte contre les salissures marines : approche par procédés enzymatiques. Thèse de doctorat, spécialité microbiologie et biocatalyse industrielle. Ecole Doctorale – SEVAB , Toulouse.206.
- Little, B., Jacobus, J.(1984).** A comparison of two techniques for the isolation of adsorbed dissolved organic material from seawater. *Org. Geochem.* 5, 1-6.

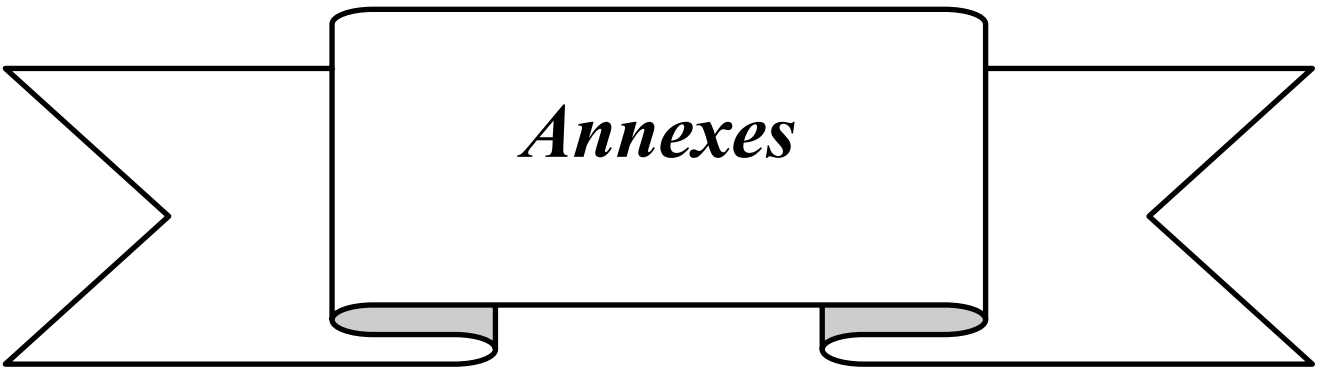
- Lock, M.A.(1993).** Attached microbial communities in rivers. In: *Aquatic Microbiology*, (Ed. T. E. Ford). Blackwell Scientific Publications, Cambridge. 113-138.
- Macheix, J.-J., Fleuriet, F., & Jay-Allemand, C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux : Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Polytechniques universitaires romandes. 192.
- McBride, R. S. (2001).** Landings, value, and fishing effort for halfbeaks, *Hemiramphus* spp., in the south Florida lampara net fishery. Proc. Gulf Caribb. Fish. Inst. 52nd Annu. Meet., Key West, Fla. 103-115.
- Médart, J. (2009).** Manuel pratique de nutrition: L'alimentation préventive et curative. *Editions De Boeck Supérieur*. 49.
- Mohamed, H., El-Sayed, M.A., Hegazy, M.E., Helaly, S.E., Esmail, A.M., and Mohamed N.S. (2010).** Chemical Constituents and Biological Activities of *Artemisia herba-alba*. *Rec Nat Prod*. 4, 1-25.
- Morales, R. (1997).** Synopsis of the genus *Thymus* L. in the Mediterranean area. *Lagascalia* .19(1-2), 249-261.
- Nabli, M. A. (1989):** Essai de synthèse sur la végétation et la phyto-écologie tunisiennes. Eléments de botanique et de phytoécologie. Flore tunisienne 4 à 6. MAB - Faculté des Sciences de Tunis, Laboratoire de botanique fondamentale et appliquée. p 247.
- Naidu, K. A. (2003).** Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An Overview. *Nutrition Journal* .2 (7), 1-10.
- Nkhili, Ez.Z. (2009).** Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du fer et du cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant. Thèse de Doctorat : Université de CADI AYYAD – MARRAKECH.185.
- Olson , B. G., Prodpran , T., Jamieson, A. M and Nazarenko , S. (2002) .** Positron annihilation in syndiotactic polystyrene containing α and β crystalline forms ,*Polymer* 43, 6775- 6784.
- O'Neill, E., Pozzi, C., Houston, P., Smyth, D., Humphreys H, Robinson, D.A., & O'Gara, J.P. (2007).** Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device-related infections. *J Clin Microbiol*.45, 1379-1388.
- O'Toole, G. A., Kolter, R. (1998).** Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* 30, 295-304.
- Packer, L., Kraemer, K. & Rimbach, G. (2001).** Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition* .17(10), 888-895.
- Palmer, M.A., Allan, J.D., Meyer, J.L., & Bernhardt, E.S. (2007) .**River restoration in the twenty-first century: data and experiential future efforts. *Restoration Ecology*. 15, 472–481.

- Papazian, L., & Roch, A. (2008).** Le syndrome de détresse respiratoire aiguë, *Edition Springer*.p 153.
- Park, H.J., and Cha ,H.C. (2003).** Flavonoids from leaves and exocarps of grape Kyoho. *Korean J Biol Sci* .7, 327-330.
- Parsek , M.R., Greenberg, E.P. (2000).** Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* .97, 8789-8793.
- Pedersen, J. A. (2000).** Distribution and taxonomic implication of some phenolics in the family Lamiaceae determined by ESR spectroscopy. *Biochem. Syst. Ecol.* 28, 229-253.
- Peeters, P., Gössling, S., & Lane, B. (2008)** .Moving towards low-carbon tourism. IN Gössling, S., Hall, C. M., & Weaver, D. (Eds.) *Sustainable Tourism Futures Perspectives on Systems, Restructuring and Innovations*.240-57.
- Pénicaud, C. (2009).** Etude et modélisation du couplage entre le transfert d'oxygène et les réactions d'oxydation dans les aliments au cours de leur conservation. Thèse de Doctorat : Université de MONTPELLIER II.
- Peterson, J., Dwyer, J., Adlercreutz, H., Scalbert, A., Jacques, P., & McCullough, M. L. (2010).** Dietary lignans: physiology and potential for cardiovascular disease risk reduction. *Nutr. Rev.* 68(10), 571-603.
- Pincemail, J., & Defraigne, J.O. (2003).** Le CoEnzyme Q10 ou ubiquinone : un antioxydant particulier. *Vaisseaux, Coeur, Poumons*. 18 (2), 55-60.
- Pincemail, J., Degruene, F., Voussure, S., Malherbe, C., Paquot, N., & Defraigne, J.O. (2007).** Effet d'une alimentation riche en fruits et légumes sur les taux plasmatiques en antioxydants et des marqueurs des dommages oxydatifs. *Nutrition clinique et métabolisme*. 21, 66-75.
- Piquet, M.A., & Hébuterne, X. (2007).** Nutrition en pathologie digestive. *Edition Wolters Kluwer France*. 93.
- Poirier, J. (2004).** L'indispensable pour vivre en santé, *Edition Merlin*, p 72.**Portes, E., (2008).** Synthèse et Etudes de étrahydrocurcuminoïdes : Propriétés photochimiques et antioxydantes, applications à la préservation de matériaux d'origine naturelle. *Thèse de doctorat*. N° 3695. Université Bordeaux I. 244.
- Pratt, L. A., and Kolter, R., (1998).** Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol. Microbiol.* 30, 285-293.
- Quenzel,P., Santa S. (1963).** Nouvelles flores d'Algérie et des régions désertiques méridionales . Tome II. Ed. CNRS Paris. 1170.
- Rasko, D.A., Altherr, M.R., Han, C.S. et Ravel, J. (2005).** Genomic of *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS Microbiology Reviews*. 29, 303-329.
- Ribéreau-Garyon, P. (1968).** Les composés phénoliques des végétaux. Edition Dunod Paris, 254.

- Rifai , N., Bachoric ,R.S and Alperrs ,J.J. (1999).** Lipid, Lipoproteins and apolipoprotein. In: Burtis CA, Ashwood ER, editors. Teitz textbook of clinical chemistry 3rd ed ., Philadelphia: W.B Saunders company.2, 809 – 861.
- Robert, D., & Catesson, A. M. (2000).** Biologie végétale : caractéristiques et stratégie évolutives des plantes. Organisation végétative. *Wolters Kluwer France Edition.2*, 320.
- Rojas, C.M., Van Grieken, R.E. (1992).** Electron-Microprobe Characterization of Individual Aerosol-Particles Collected by Aircraft above the Southern Bight of the North-Sea. *Atmospheric Environment Part a-General Topics*. 26, 1231-1237.
- Roux, D., & Catier, O. (2007).** Botanique, Pharmacognosie et Phytothérapie. *Wolters Kluwer France Edition*. p 74.
- Sadasivam, S., & Thayumanavan, B. (2003).** Molecular host plant resistance to pests. Volume 96 de Books in soils, plants and the environment. *CRC Press*. p221.
- Saleh, N. A. M., El- Negoumy, S .I., Abd-Alla, M .F., Abou- Zaid ,M. M., Dellamonica, G., Chopin, J. (1985).** Flavonoid glycosides of *Artemisia monosperma* and *A. herba alba*. *Phytochemistry*.24, 201 - 203.
- Salgueiro, L. R., Vila, R., Tomi, F., Filgueredo, A. C., Barroso, J. G., Canigueral, S., Casanova, J., Proenca, A., Adzet, T. (1997).** Variability of essential oils of *Thymus caespititus* from Portugal. *J. of Phytochemistry*, 45, pp: 307-311 .
- Samapundo, S., Heyndrickx, M., Xhaferi, R. & Devlieghere, F. (2011).**Incidence, diversity and toxin gene characteristics of *Bacillus cereus* group strains isolated from food products marketed in Belgium. *International Journal of Food Microbiology* .150, 34-41.
- Saoudi, M., Allagui, M.S., Abdelmouleh, A., Jamoussi, K., and El Feki, A. (2010).** Protective effects of aqueous extract of *Artemisia campestris* against puffer fish *Lagocephalus* extract-induced oxidative damage in rats. *Exp.Tox.Pathol*.62, 601-605.
- Sauer, K., Camper, A.K., Eherlich, G.D., Costerton, J.W., Davies D.G. (2002).** *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J. Bacteriol*.184, 1140-1154.
- Sauer, K., Cullen, M.C., Rickard, A.H., Zeef, L.A.H., Davies, D.G., Gilbert P. (2004).** Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm. *J. Bacteriol*. 186, 7312-7326.
- Saulou, C. (2009).** Evaluation des proprietes anti-adhesives et biocides des films nanocomposites avec inclusions d'argent deposees sur acier inoxydable par procede plasma. Thèse de doctorat en ingenierie microbienne et enzymatique. Institut nationale des sciences appliquees. 312.
- Shahidi, F., Naczki, M. (2004).** Extraction and analysis of phenolics in food; *Journal of Chromatography A* 1054; Ed: ELSEVIER. 95-111.

- Shinagawa, K. (1990).** Analytical methods for *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. *Int. J. Food Microbiol.* 10, 125-141.
- Siddhuraju, P., Becker, K. (2007).** The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed extracts. *Food Chemistry.* 101, 10-19.
- Spiers, A.J., Bohannon, J., Gehrig, S.M., Rainey, P.B. (2003).** Biofilm formation at the air-liquid interface by the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose. *Mol. Microbiol.* 50, 15-27.
- Spiller, G., & Spiller, M. (2007).** Tout savoir sur les fibres. *Editions le mieux-etre.* p27.
- Srey, S., Jahid, I.K., Ha S.D. (2013).** Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food control.* 31, 572-585.
- Stanley, N.R., Lazazzera, B.A., Britton, R.A., Grossman A.D. (2003).** Identification of catabolite repression as a physiological regulator of biofilm formation by *Bacillus subtilis* by use of DNA microarray. *J. Bacteriol.* 185, 1951-1957.
- Stenfors Arnesen, L .P., Fagerlund ,A., Granum,P.E.(2008).**from soil to gut : *Bacillus cereus*.and its food poisoning toxins ,fems microbiology reviews.32(4),579-606.
- Stocker, R., Yamamoto, Y., McDonagh, A. F., Glazer, A. N., & Ames, B. N. (1987).** Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science.* 235 (4792), 1043-1046.
- Stoodley, P., Sauer , K., Davies, D. G., Costerton ,J. W. (2002).** Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 187-209.
- Suci, P.A., Mittelman, M.W., Yu, F.P., Geesey, G.G. (1994).** Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38, 2125-2133.
- Sun, B., Ribes, A. M., Leandro, M. C., Belchior, A. P., & Spranger, M. I. (2006).** Stilbenes: Quantitative extraction from grape skins, contribution of grape solids to wine and variation during wine maturation. *Analytica Chimica Acta.* 563, 382–390.
- Sutherland, I.W.(2001).** The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol.* 9, 222-227.
- Tadhani, M.B., Patel, V.H., Subhash, R. (2007).** In vitro antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. *J. Food Composit. Anal.* 20, 323-329.
- Tapas, A. R., Sakarkar, D. M. & Kakde, R. B. (2008).** Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research .7* (3), 1089-1099.
- Ternstrom, A., Molin, G. (1987).** Incidence of potential pathogens on raw pork, beef and chicken in Sweden, with special reference to *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *J. Food Prot.* 50, 141-146.
- Torres de pinedo, A., Pen alver, P., Morales, J.C. (2007).** Synthesis and evaluation of new phenolic-based antioxidant : structure-activity relationship.*Food Chemistry.*103 ,55-61.

- Turrens, J. F. (1997).** Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Bioscience Reports*. 17(1), 3-8.
- Vermerris, W., et Nicholson, R.(2006).** Phenolic compound chemistry; Ed: Springer.1-70.
- Villaño, D., Fernández-Pachón, M. S., Moyá, M. L., Troncoso, A. M. & García-Parrilla, M. C. (2007).** Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta* .71, 230-235.
- Vincenot, F., Saleh, M., Prévost, G. (2008).** Les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*. *Rev Francoph Lab*.407, 61-9.
- Visioli, F., Borsani, L. & Galli, C. (2000).** Diet and prevention of coronary heart disease: the potential role of Phytochemicals. *Cardiovascular Research* .47, 419-425.
- Vlkova, H., Babak, V., Seydlova, R., Pavlik, I., and Schlegelova J. (2008).** Biofilms and hygiene on dairy farms and in the dairy industry: sanitation chemical products and effectiveness on biofilms – a review. *Czech j. food.sci.* 26, (5): 309-323.
- Waksmundzka-Hajnos, M., & Sherma, J. (2011).** High Performance Liquid .Characklis, W.G., Marshall, K.C. (1990). Biofilms. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y Chromatography in Phytochemical ience. *Chromatographic Science Serie.* 477-478.
- Walker, G., (1972).** The biochemical composition of the cement of two barnacles species, *Balanus hameri* and *Balanus crenatus*. *Journal of the marine biological association of the U.K.* 52, 429-435.
- Wan, J., Wilcock, A., and Coventry, M.J. (1998)** .The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Applied Microbiology* .84, 152-158.
- Wang, X. & Quinn, P. J. (2006).**The structure and phase behaviour of α -tocopherol-rich domains in 1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylethanolamine. *Biochimie.* 88, 1883-1888.
- Wetherbee, R., Lind, J.L., Burke, J. (1998).** The first kiss: establishment and control of initial adhesion by raphid diatoms. *Journal of phycology.* 34, 9-15.
- Wirdel, P., 2003.** Investigation phytochimique des plantes aquatiques *Potamogeton pectinatus* L., *P. lucens* L. (*Potamogetonaceae*). Thèse de Doctorat, Université de Lausanne.
- Yule, A., and Walker, G. (1984).** a The adhesion of *Balanus balanoides*: the effect of cyprids antennular secretion. *Journal of the marine biological association of the U.K.* 64, 439-442.
- Zeghad, N. (2009).** Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne Mémoire de Magister Université de Constantine. 17-19,41-69.
- Zovko Cončić, M., Kremer, D., Karlović, K., Kosalec, I. (2010).** Evaluation of antioxidant activities and phenolic content of *Berberis vulgaris* L. and *Berberis croatica* Horvat. *Food Chem Toxicol.* 48 ,2176 -2180.



Annexes

Annexe n°1

Composition de bouillon nutritif BN

Peptone	10g
Extrait de levure	3g
Extrait de viande	5g
NaCl	5g

Composition de Gélose MUELLER-HINTON (MH)

Infusion de viande de bœuf....	300 mL
Peptone de caséine.....	17,5 g
Amidon de maïs.....	1,5 g
Agar.....	17 g
pH final = 7,4	

I. Dosage des polyphénols

Préparation de 20ml de 7,5 % de NaCO₃

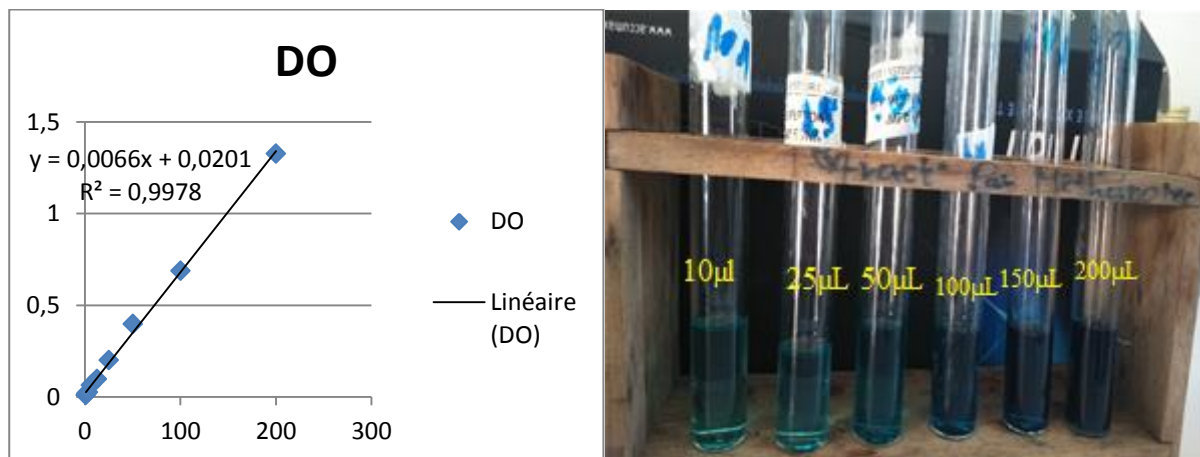
7,5 g NaCO₃ —————> 100ml (eau.d)

X' g —————> 20 ml

$X' = 20 \times 7,5 / 100$ —————> X = 1,5 g

Les DO des extraits polyphénol (à 765 nm)

	10µl	25 µl	50 µl	100 µl	150 µl	200 µl
THYMUS	2,02	14,52	39,53	76,31	104,64	130,75
ART	4,22	32,91	49,1	96,18	123,76	161,64



La courbe étalon de l'acide gallique

Dosage des flavonoïdes

Préparation de 20ml de Nitrate de sodium (NaNO₃)

0,5g NaNO₃ —————> 100ml (eau.d)

X'' g —————> 20 ml

$X'' = 20 \times 0,5 / 100$ —————> $X'' = 0,1$ g

Préparation de 20ml de 10% AlCl₃

0,5g AlCl₃ —————> 100ml (eau.d)

Y g —————> 20 ml

$Y = 20 \times 10 / 100$ —————> $Y = 2$ g

Préparation de 20ml d'une mole d'Hydroxyde de sodium (NaOH)

On a : $M_{\text{NaOH}} = 40$ g/ mol

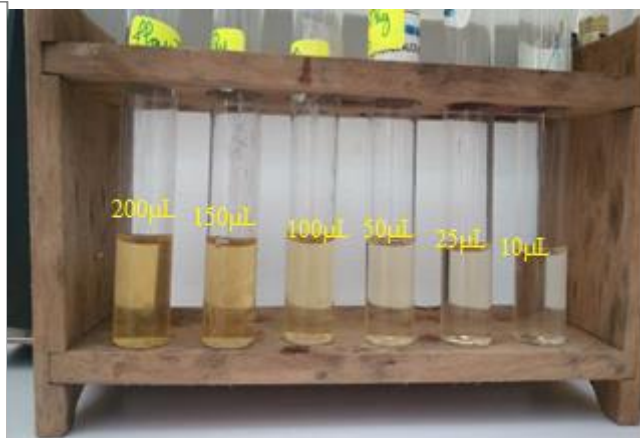
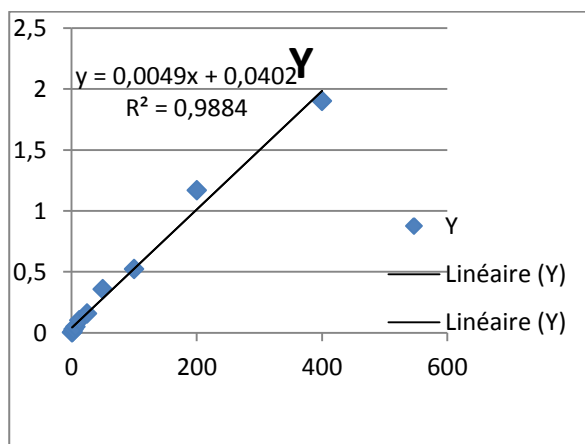
→ 40 g NaOH —————> 1mol (100 ml)

Y' g —————> 20 ml

$Y' = 20 \times 10 / 100$ —————> $Y' = 2$ g

Les DO des extraits flavonoides (à 510 nm)

	10 µL	25 µL	50 µL	100	150	200
Thymus	2,14	14,4	39,65	76,31	105,003	131,11
Artemisia	4,22	33,12	48,73	95,81	123,39	161,52



La courbe étalon de la quercétine

Test de l'effet antioxydant :

I. Test DPPH :

Préparation de 1Mm de DPPH

0,04 —————> 100 ml

X —————> 10 ml

$X = 10 * 0,04 / 100$ —————> $X = 0,004$ g

II. Test FRAP :

Préparation de 50 ml de $K_3[Fe(CN)_6]$ a 1%

1 g $K_3[Fe(CN)_6]$ —————> 100ml (eau.d)

Y'' g —————> 50 ml

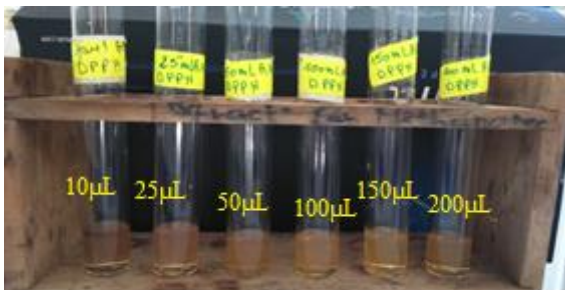
$Y'' = 50 * 1 / 100$ —————> $X'' = 0,5$ g

Préparation de 20ml de Nitrate de sodium ($NaNO_3$)

10 g TCA —————> 100ml (eau.d)

Z g —————> 10 ml

$Z = 10 * 10 / 100$ —————> $Z = 1$ g



Méthode DPPH



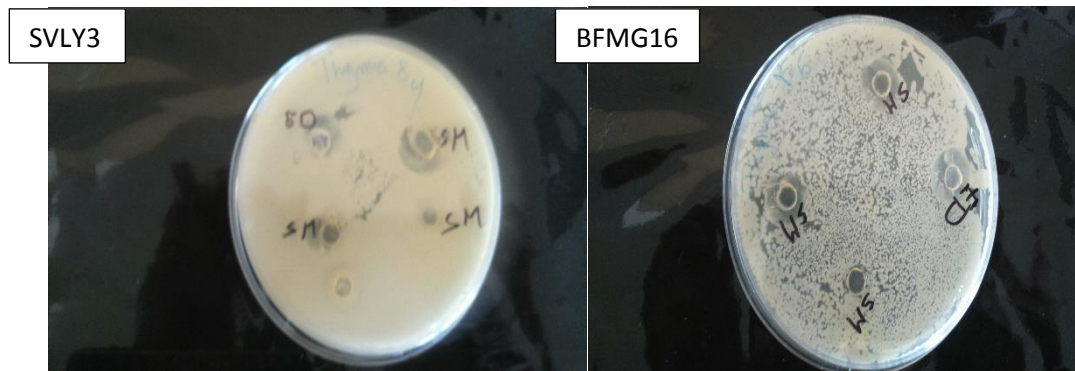
Méthode FRAP

Annexe n°2

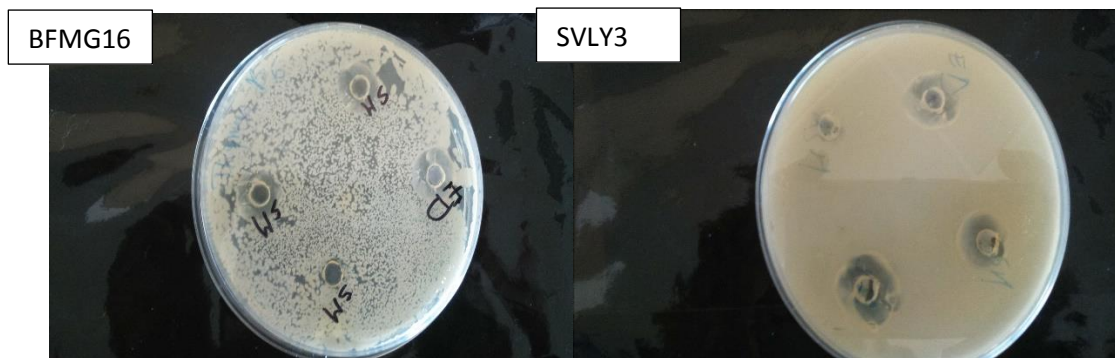
Test de l'activité antibactérienne

Tableau Activité antibactérienne de l'extrait méthanolique *Thymus capitatus*

	BFM G16	BLP2	BPTS 1	BRIS 3	BCSV 1	SVLY 3	SPTS 2R	SFM G5BP	SLG M1	SSEM 4
Thymus	15,66± 0,57	12,66 ± 0,57	10,66 ± 1,52	15 ± 0,57	13,66 ± 0,57	16,66 ± 0,57	15,33 ± 0,57	13 ± 0,57	15,33± 1,52	13,66 ± 0,57
Artemisi a	14 ± 0,57	12,66 ± 0,577	11,66 ± 0,577	22,66 ± 2,51	16,66 ± 1,52	17,66 ± 0,57	15,66 ± 0,57	13,6 ± 0,57	22,33 ± 1,52	16,66 ± 1,52



Effet antibactérien de l'extrait méthanolique de *Thymus capitatus*



Effet antibactérien de l'extrait méthanolique d'*Artemisia herba alba*

