

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Ibn Khaldoun-Tiaret



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire en vue de l'obtention du diplôme du Master académique

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Infectiologie

Présenté et soutenu publiquement par

- Boumediene Nabila

- Boughlem Rania Lina

Thème

Activité biologique d'*Urginea maritima*

JURY :

- | | | |
|-------------------------------|-------|-----|
| - Président : Dr. Mihoub F. | Grade | MCA |
| - Promoteur : Mr Dahmani W. | Grade | MAA |
| - Examineur : Dr. Benaraba R. | Grade | MCA |

Année universitaire : 2017-2018

Remerciements

Nous remercions **ALLAH** le tout puissant de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

Nous tenons à exprimer toute notre gratitude et à remercier chaleureusement Monsieur **DAHMANI W.** pour avoir accepté d'encadrer notre travail, pour ses conseils, et son aide ainsi que pour sa gentillesse et sa disponibilité, son assistance et son soutien indéfectible.

Nous aimerions exprimer notre gratitude et nos remerciements les plus sincères aux :

Dr **MIHOUB F.** , qui a bien voulu honoré ce travail en acceptant de présider le jury.

Dr **BEN ARABA R.** pour avoir accepté de faire partie du jury et d'examiner ce travail.

N'oublions pas nos parents pour leur contribution, leur soutien et leur patience.

Enfin, nous adressons nos remerciements à tous nos proches et amis qui nous ont toujours soutenues et encouragées au cours de la réalisation de ce mémoire.

Dédicace

Nous dédions ce modeste travail à :

Nos chers parents

Nos frères et sœurs

Nos amis : Chahinez, khadidja, Bochra et Othman.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à :

Boumediene Lakhdar

Boughlem Noureddine

Bousoir Kheira

Maamar Yamina

Maamar Leila

Boumediene Souad

Boumediene Nawal

Et Mr Aziz.

Merci à toutes et à tous.

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des annexes

Introduction

PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Généralités sur *Urginea maritima* .

I.1. Définition	3
I.2. Historique	3
I.3. Systématique	5
I.4. Etymologie	5
I.5. Description de l'espèce	6
I.6. Origine et répartition géographique	7
I.7. Effets biologiques d' <i>Urginea maritima</i>	7
I.8. Usages médicaux	8
I.9. Usages en agriculture	8
I.10. Toxicité	9

Chapitre II : Métabolites secondaires.

II.1. Composés phénoliques	10
II.2. Principales classes des composés phénoliques	11
II.3. Actions biologiques des composés phénoliques	12
II.4. Composition d' <i>Urginea maritima</i> en métabolites secondaires	12
II.4.1. Stéroïdes	12
II.4.2. Flavonoïdes	13
II.4.3. Acides phénoliques	15

DEUXIEME PARTIE : PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre I : Matériel et méthodes.

I.1. Objectifs du travail	17
I.2. Lieu et période de travail	17
I.3. Matériel et méthodes	17
I.3.1. Matériel de laboratoire	17
I.3.1.1. Verrerie, appareillage et produits utilisés	17
I.3.2. Matériel biologique	19
I.3.2.1. Matériel végétal	19
I.3.2.2. Souches bactériennes testées	20

I.3.2.3. Champignons testés	21
I.4. Protocole expérimental	21
I.4.1. Extraction et dosage des composés phénoliques	23
I.4.1.1. Extraction méthanolique	23
I.4.2. Caractérisation de l'extrait méthanolique par HPLC	23
I.4.2.1. Principe	24
I.4.2.2. Protocole	25
I.4.3. Dosage des composés phénoliques totaux	25
I.4.3.1. Principe	25
I.4.3.2. Protocole	25
I.4.4. Screening phytochimique	26
I.4.5. Activité antioxydante	27
II. Ré-identification des souches bactériennes	28
II.1. Examens macroscopiques	29
II.1.1. Examen à l'état frais	29
II.1.2. Ensemencement	29
II.2. Test microscopique	29
II.2.1. Coloration de Gram	29
II.3. Tests d'identifications biochimiques classiques	30
II.3.1. Tests communs	30
II.3.2. Tests caractéristiques	33
II.4. Galeries API	34
II.4.1. API 20 NE	34
II.4.2. API 20 E	35
II.4.3. API Staph	36
II.5. Antibiogrammes	36
III. Activité antibactérienne	37
III.1. Evaluation de l'effet antibactérien de l'extrait méthanolique sur les souches étudiées	37
III.1.1. Aromatogramme	37
III.2. Evaluation de l'effet antifongique de l'extrait méthanolique sur les souches étudiées	38

Chapitre II : RESULTATS ET DISCUSSIONS.

II.1. Taux d'humidité	39
II.2. Rendement de l'extrait méthanolique	39
II.3. Screening phytochimique	40
II.4. Dosage des polyphénols totaux	40
II.5. Activité antioxydante	42
II.6. Résultats de la ré-identification bactérienne	42
II.7. Caractérisation par HPLC	46

II.8. Résultats de l'activité antibactérienne

47

II.9. Résultats de l'activité antifongique

51

Conclusion

Références bibliographiques

Annexes

Liste des abréviations

HPLC : Chromatographie liquide à haute performance.

ATCC : American type culture collection.

DPPH : 1,1 Diphényl 2 Pycril Hydrazil.

API: Analytical Profile Index.

V : Volume.

IC₅₀ : Concentration inhibitrice à 50%.

DO : Densité optique.

S. aureus : *Staphylococcus aureus*.

E. coli : *Escherichia coli*.

P. aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa*.

Mg EAG/g : Milligramme d'équivalent d'acide gallique par 100 grammes d'extrait.

ONPG : Ortho Nitrophényl-βd-galactopyranoside.

ADH : Arginine dihydrolase.

LDC : Lysine décarboxylase.

ODC : Ornithine décarboxylase.

URE : Uréase.

TDA : Tryptophane désaminase.

VP : Voges Proskauer.

GEL : Gélatinase .

GLU : Glucose.

MAN : Mannitol.

INO : Inositol.

SOR : Sorbitol.

RHA : Rhamnose.

SAC : Saccharose.

MEL : Melibiose.

AMY : Amygdaline.

ARA : Arabinose.

NO₃ : Potassium nitrate.

TRP : Tryptophane.

ESC : Esculine.

PNPG : Para-Nitrophényl-βD- Galactopyranoside.

MNE : Mannose.

NAG : N-Acetyl glucosamine.

MAL : Maltose.

GNT : Potassium gluconate.

CAP : Acide caprique.

ADI : Acide adipique.

MLT : Acide malique.

CIT : Trisodium citrate.

PAC : Acide phénylacétique

LAC : Lactose.

TRE : Tréhalose.

XLT : Xylitol

PAL : β-naphtyl phosphate.

RAF : Raffinose.

XYL : Xylose.

MDG : Méthyl- α D –glucopyranoside.

Mg eq AG/g d'extrait : Milligramme équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait.

Liste des figures

Figure N° 1 : Papyrus Ebers et l'une des plus anciennes prescriptions médicales à base d' <i>Urginea maritima</i>	3
Figure N° 2 : La plus ancienne image d' <i>Urginea maritima</i>	4
Figure N° 3 : Evolution de la classification d' <i>Urginea maritima</i> au fil du temps	5
Figure N° 4 : Situation géographique de la zone de récolte (Matrounia, Medrissa)	19
Figure N° 5 : Préparation de l'échantillon étudié	20
Figure N° 6 : Protocole expérimental	22
Figure N°7 : L'équipement HPLC	24
Figure N°8 : Schéma du principe de HPLC	24
Figure N°9 : Réaction de neutralisation des radicaux libres	28
Figure N°10 : L'absorbance de l'extrait d' <i>U.maritima</i> en polyphénols en fonction des concentrations	40
Figure N°11 : L'activité antioxydante de l'extrait brut par la méthode de DPPH	42
Figure N°12 : Caractères macroscopiques des souches étudiées sur leurs géloses sélectives	42
Figure N°13 : Test d'antibiogramme pour les 3 souches	44
Figure N°14 : Chromatogramme des pics de base de l'extrait hydrométhanolique d' <i>Urginea maritima</i>	46
Figure N°15 : Effet de l'extrait méthanolique d' <i>Urginea maritima</i> sur le développement de <i>Staphylococcus aureus</i> en milieu solide par la technique de diffusion	48
Figure N°16 : Effet de l'extrait méthanolique d' <i>Urginea maritima</i> sur le développement de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en milieu solide par la technique de diffusion	49
Figure N°17 : Effet de l'extrait méthanolique d' <i>Urginea maritima</i> sur le développement de <i>Escherichia coli</i> en milieu solide par la technique de diffusion	50
Figure N°18 : Effet de l'extrait méthanolique d' <i>U.maritima</i> sur le développement de <i>F.oxysporum</i> dans le 7 ^{ème} jour	51
Figure N°19 : Effet de l'extrait méthanolique d' <i>U.maritima</i> sur le développement de <i>F.oxysporum</i> au cours de la semaine	52
Figure N°20 : Effet de l'extrait méthanolique d' <i>U.maritima</i> sur le développement d' <i>A.niger</i> dans le 7 ^{ème} jour	52
Figure N°21 : Effet de l'extrait méthanolique d' <i>U.maritima</i> sur le développement d' <i>A.niger</i> au cours de la semaine	53
Figure N°22 : Comparaison de l'effet de l'extrait méthanolique d' <i>Urginea maritima</i> sur le développement de <i>F.oxysporum</i> et <i>A.niger</i> dans le 7 ^{ème} jour	53

Liste des tableaux

Tableau N°1 : Description d' <i>Urginea maritima</i>	6
Tableau N°2 : Types de stéroïdes présents dans <i>U.maritima</i>	13
Tableau N°3 : Types de flavonoïdes présents dans <i>U.maritima</i>	14
Tableau N°4 : Types de phénols présents dans <i>U.maritima</i>	15
Tableau N°5 : Liste de verrerie, appareillage et produits utilisés	18
Tableau N°6 : Résultats des tests de criblage phytochimique	40
Tableau N°7 : Résultats des tests d'identification biochimiques classiques (tests communs)	43
Tableau N°08 : Résultats des tests d'identification biochimiques classiques tests spécifiques pour <i>Escherichia coli</i>	43
Tableau N°09 : Résultats des tests d'identification biochimiques classiques tests spécifiques pour <i>Staphylococcus aureus</i>	44
Tableau N°10 : Résultats des tests d'identification biochimiques classiques tests spécifiques pour <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	44
Tableau N°11 : Antibiogramme d' <i>E.coli</i>	45
Tableau N°12 : Antibiogramme d' <i>S.aureus</i>	45
Tableau N°13 : Antibiogramme d' <i>P.aeruginosa</i>	45
Tableau N°14 : Affectations de pointe pour les composés identifiés dans l'extrait de bulbes d' <i>Urginea maritima</i> par HPLC	46
Tableau N°15 :Diamètre (mm) de zone d'inhibition de la croissance des trois souches bactériennes testées	47
Tableau N°16 : Tableau comparatif de l'effet antifongique exercée par les bactéries <i>Bacillus thuringiensis</i> et <i>Bacillus licheniformis</i> productrices de la chitinase et par l'extrait méthanolique d' <i>U.maritima</i>	54

Liste des annexes

Annexe N°01 : Coloration de Gram

Annexe N°02 : Lecture des résultats des galeries API

Annexe N°03 : Tableaux de lecture des galeries API

Annexe N°04 : Composition des principaux milieux de culture utilisés

Annexe N°05 : Réactifs et solutions

Annexe N°06 : Courbes d'étalonnage

INTRODUCTION

Liste des annexes

Annexe N°1 : Coloration de Gram.....	I
Annexe N°2 : Résultats des tests de la ré-identification bactérienne.....	II
Annexe N°3 : Lectures des résultats des galeries API.....	III
Annexe N°4 : L'effet antibactérien de l'extrait hydrométhanolique d' <i>Urginea maritima</i> sur les bactéries testées.....	IV
Annexe N°5 : Composition des principaux milieux de culture utilisés.....	V
Annexe N°6 : Réactifs et solutions.....	VI

Introduction

Depuis des milliers d'années, l'humanité a utilisé diverses plantes trouvées dans son environnement, afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies durant des siècles et même des millénaires.

Une des formules médicales les plus anciennes figurant sur un papyrus datant plus de 3500 ans, contient une prescription dans laquelle la scille est indiquée. *Urginea maritima* L. Stearn (Squill) est originaire de la région méditerranéenne, de l'Afrique et de l'Inde (Stedje, 1987). Cette plante et ses formulations comme Squill Oxymel ont été largement utilisées par les praticiens TIM pour traiter les différents troubles (Aghili, 2009 ; Ibn Sina, 2005), y compris la mélancolie, la paralysie, la dyspepsie, la flatulence, la jaunisse, l'ascite, la sciatique et l'arthrite. Cependant, Squill Oxymel était le plus couramment utilisé pour des troubles respiratoires tels que l'enrouement, la pneumonie, la bronchite chronique, la toux chronique et l'asthme (Aghili, 2009; Ibn Sina, 2005; Karegar-Borzi *et al.*, 2015). Squill a été signalé à exercer un effet anti-inflammatoire, anti-oxydant, effets modulateurs antibactériens, anti-cholinergiques et de sécrétion de mucus. Il est indispensable de connaître la composition des plantes pour comprendre comment elles agissent sur l'organisme. Parmi ses composants les principales : les phénols et les flavonoïdes qui sont fortement bioactives.

En Afrique, comme dans le reste du monde, plus de 75% de la population a recours à la médecine traditionnelle et aux plantes médicinales pour ses soins de santé primaire. Le manque de médicaments essentiels, l'insuffisance des soins de santé, le coût élevé des médicaments et les habitudes socioculturelles des populations expliquent le recours aux pratiques traditionnelles à base de plantes médicinales. L'art de guérir par les plantes est connu depuis bien longtemps (pratiqué par les tradipraticiens de santé et les herboristes). (Jean-Louis Pousset 1989).

Les plantes médicinales et les connaissances relatives aux plantes médicinales et aux médecines traditionnelles sont un patrimoine important du continent africain. La résistance aux antibiotiques est un enjeu de santé publique important (Alanis, 2005). En pharmacopée africaine de nombreuses plantes médicinales endémiques sont employées pour traiter plusieurs affections microbiennes. Des études récentes sont portées sur de nouvelles molécules issues de ces substances naturelles (Fernique *et al.*, 2014). Donc, il est nécessaire d'exploiter ces plantes pour résoudre le problème des infections nosocomiales et pour celles des immunodéprimés, ainsi que les infections fongiques graves.

Alors la question qui se pose, comment résoudre le phénomène de l'antibiorésistance qui est en progression constante ?

Introduction

Dans ce contexte les objectifs de cette étude consiste à :

- Résoudre le problème d'antibiorésistance par l'introduction des plantes médicinales dans l'antibiothérapie.
- Valoriser des plantes sauvages de la région de Tiaret source naturelle en continu.
- L'objectif principal de cette étude est de déterminer de la teneur en molécules actives notamment les polyphénols et les flavonoïdes a action antimicrobienne et antioxydante.

PREMIÈRE PARTIE

ETUDE

BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I
GENERALITES SUR
URGINEA
MARITIMA

I.1. Définition

Urginea maritima est une plante herbacée de la famille des liliacées, elle est originaire de la région méditerranéenne, qui s'est adaptée à son climat. Elle est connue comme plante médicinale et ornementale depuis très longtemps. C'est une plante sauvage qui pousse naturellement dans les sols secs et sablonneux près de la mer, à une altitude de 1300 mètres, C'est une plante bulbeuse vivace hivernale (automne, printemps) dont on distingue deux variétés, Scille rouge et Scille blanche (Dizaye et Hamad 2010; Aasim et al., 2008).

I.2. Historique

Depuis longtemps, la scille a été connue par ses propriétés curatives. Les études historiques de Scheer et Sigerist montrent que les Egyptiens avaient érigé un temple en l'honneur de la scille. En Grèce, Phythafore et plus tard Theophraste, accordaient à cette plante d'importantes vertus thérapeutiques. Une des formules médicales les plus anciennes figurant sur le papyrus d'Eber datant de plus de 3500 ans (Voir Fig. N°1), qui contient une prescription dans laquelle la scille est indiquée (Arthur, 1954).



- Farine de dattes ¼
- Scille maritime 1/32
- Amamu 1/3
- Bière douce 1/3
- Tehebu 1/2
- *faire cuire, filtrer,
traitement dure 4 jours.

Figure N° 01: Papyrus Ebers est l'une des plus anciennes prescriptions médicales à base d'*Urginea maritima* (Arthur, 1954).

C'est Van Swieten en particulier qui au milieu du XVIII^e siècle, a attiré l'attention sur l'importance de la scille dans le traitement de l'hydropisie, il utilisait déjà la drogue fraîche qu'il avait

trouvé spécialement active. Mais lorsque William Withering , médecin écossais, a introduit en 1785 la digitale dans le traitement des maladies du cœur, la scille est passée à l'arrière-plan, malgré la découverte de Holmes que la scille agissait aussi sur le cœur (Arthur, 1954).

En dépit du fait que la scille figurait toujours depuis les plus anciennes notes dans les codes pharmaceutiques, sous forme, il est vrai, des préparations galéniques peu actives, il a fallu attendre jusqu'en 1918 pour que l'attention se retourne vers elle. Le médecin allemand Mendel a employé, dans de nombreuses affections cardiaques, une préparation de scille séchée, sans toutefois obtenir des résultats entièrement convaincants, car le séchage faisait perdre à la drogue une partie de ses substances actives. C'est ainsi que Mark Walder a pu montrer que les préparations galéniques pouvaient varier à cent pour cent (Arthur, 1954).

Voici la plus ancienne image trouvée est un dessin qui provient d'un manuscrit de Dioscoride, du VI siècles.



Figure N°02: La plus ancienne image d'*Urginea maritima* (Arthur, 1954).

I.3. Systématique

La classification de cette plante a été développée au fil du temps. Elle est représentée dans la figure N°03.

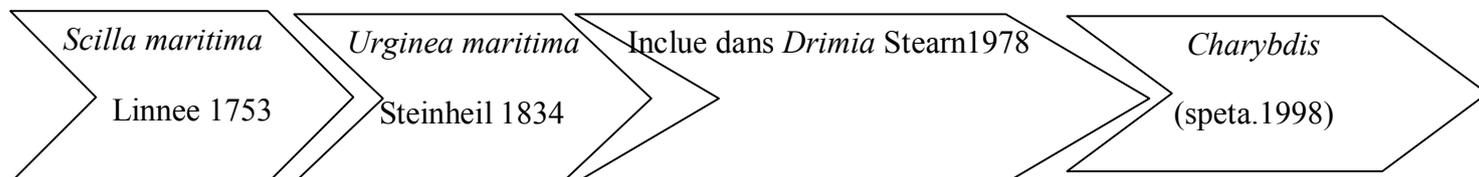


Figure N°03 : Evolution de la classification d'*Urginea maritima* au fil du temps.

➤ Classification selon APG (Angiosperms Phylogeny Group) (Quezel 1963)

- Règne : Plantae

- Classe : Monocotyledoneae

- Ordre : Asparagales

- Famille : Asparagaceae

- Genre : *Urginea L.*

- Espèce : *Urginea maritima (L.) Baker*

I.4. Etymologie

- Noms communs : *Scille maritime* ou Scille officinale, squille, urginée maritime, urginée fausse-suille, charpentaire, oignon marin, scipoule.
- Nom latin : *Urginea maritima*.
- Nom anglais : Red squill, sea squill.
- Nom arabe : Feraoune. بصيلة - Bassila
- Nom berbère: إشقيل – Ichkil

I.5. Description de l'espèce

La description botanique d'*Urginea maritima* est représentée dans le tableau N°1 Quezel (1962) et Maire (1958)

Tableau N°01 : Description d'*Urginea maritima* (Quezel, 1962 et Maire, 1958)

	Taille	Couleur	Forme	Diamètre	Nbre
Tige	0.40 à 1.60m	Verte ou glauque	Florifère dressé- lisse	15mm	/
Feuille	1m long 5-15cm de largeur	/	Basales, en rosette, dressé, hystéranthiées- Largement lancéolée- aigue ou subobtuses apiculée- épaisse	/	5-9
Bulbe	1m	Rougeâtre	Epigé au sommet- Ovoïde-	18cm	/
Tunique	/	rouge brun ou blanchâtre	Epaisse et coriace	/	/
Racines	/	/	Sortent toute à la base-	/	/
Fleur	60cm	Blanchâtre	Longue et dense- peu chevelue- étoile	/	6-8
Bractée	8mm	Blanchâtre gémées	Membraneuses- flexueuse à éperon	/	/
Tépale	/	Vert ou pourpre	Oblongue- nervure unique	/	/
Etamine	/	/	Périanthe, filet blanc aplatis- dilaté vers la base	/	6
Anthère	/	Jaune verdâtre à gris violacé	Ové ou oblong trisulqué	/	/
Graine	1-4 par loge	Noires	Oblong, aplatis, lisse, luisantes	/	/

I.6. Origine et répartition géographique

La scille est spontanée sur les rivages sablonneux de la mer méditerranée mais elle se retrouve aussi dans les pâturages, forêts et roches (Quezel et Santa, 1963).

La variété blanche dite Scille d'Italie ou Scille femelle est abondante en Sicile, Malte, Grèce, Espagne, Italie et Liban. En Algérie, on trouve la variété rouge appelée Scille d'Espagne ou Scille male (Paris et Moysse, 1967).

La scille se retrouve sur les côtes Atlantiques, Portugal, au Canaries et au Maroc (Reynolds, 1996).

I.7. Effets biologiques d'*Urginea maritima*

Les études sur les bulbes et les feuilles d'*U.maritima* ont montré des activités potentiellement (Dizaye et Hamad, 2010) :

- Antifongiques. (extrait aqueux des bulbes / *Fusarium oxysporum f. sp. albedinis*, *Alternaria sp*, *Penicillium expansum*, *Aspergillus brasiliensis*, *Rhizopus stolonifer*).
- Antibactérienne. (extrait éthanolique/*Staphylococcus aureus*,*E.coli*)
- Insecticides. (extrait méthanolique des feuilles et des bulbes /*Tribolium castaneum*).
- Rodenticides. (extrait des bulbes fraîches/les rats).
- Nematicides

Mais également des activités thérapeutiques comme (Dizaye et Hamad, 2010) :

- Effet inotrope positif qui résulte du blocage des pompes Na^+/K^+ et ATPase par le composant glycosidiques.
- Effet diurétique et un effet antrutique.
- Effet hypotenseur.

La biotransformation du bufadienolides qui est le composant caractéristique de la plante, montre une activité cytotoxique puissante sur des cellules cancéreuses (Dizaye et Hamad, 2010).

I.8. Usages médicaux

Seuls les glucosides cardiotoniques, sont très diurétiques et agissent rapidement. De ce fait la scille traite de nombreux troubles, telle la rétention d'eau. Comme ses constituants sont rapidement éliminés par l'organisme, contrairement aux substances présentes dans la digitale pourpre, la scille remplace efficacement celle-ci pour soigner des insuffisances cardiaques. A faibles doses, elle présente des propriétés vomitives. On l'utilise aussi en homéopathie (Iserin, 2001).

En médecine iranienne traditionnelle, Squill Oxymel a été utilisé dans le traitement de l'asthme. IL a été signalé à exercer un effet anti-inflammatoire, effets modulateurs antioxydants, anti-cholinergiques et de sécrétion de mucus (Fatemeh et *al.*, 2017). Il s'agit d'une plante dans le temps à divers usages, car selon El Hafian et *al.*, 2014 et Benkhniq et *al.*, 2011 ; elle était utilisée pour traiter:

- L'asthme
- Les douleurs de l'oreille sous forme de goutte
- Les problèmes dermatologiques
- Les pathologies digestives
- Les problèmes cardiaques, la coqueluche et l'hépatite
- Comme abortif par voie interne ou en fumigations vaginales

Des études récentes ont montré que ce miracle naturel peut traiter des maladies malignes comme :

- neuroblastome humain SH-SY5Y.
- la mélanogénèse.

De plus les bulbes frais sont appliqués sur les plaies pour accélérer la cicatrisation, les œdèmes, la goutte et ralentir le pouls (Nejatbakhsha et *al.*, 2017) .

I.9. Usages en agriculture

Les produits chimiques utilisés pour le contrôle agricole sont une source importante de pollution de l'environnement. Il est donc nécessaire de trouver des alternatives à ces produits chimiques qui sont largement utilisés et pourraient être un moyen indispensable de lutter pour

l'agriculture ; L'extrait d' *U maritima* peut être utilisé pour plus de sécurité mieux que les pesticides chimiques (Metin et *al.*, 2014)

La composition chimique de l' *U.maritima* est complexe et aussi bien étudiée, en raison de son glycoside cardiaque (médicament) et des activités raticides. Ils ont montré que le feuillage de *U. maritima* était très toxique pour les larves de lépidoptères, tel que *Spodoptera littoralis*, (qui contenaient de l'AZA). Et quand il est ajouté à un régime artificiel, cause 100% de mortalité. Par la suite, Adeyeye et Blum (1989) ont trouvé que l'AZA incorporé dans le régime artificiel d'une autre espèce de lépidoptère *Helicoverpa zea*, perturbe la croissance et le développement (Galip, 2009).

I.10. Toxicité

Cette plante est toxique pour l'homme et l'animal, et se manifeste par des vertiges, des nausées, des vomissements, des diarrhées, de l'hypertension, des douleurs dans le ventre et dans les jambes. Dans des cas graves survient un coma puis la mort du à un arrêt cardiaque (Bellakhdar, 1997; Hmamouchi, 1999).

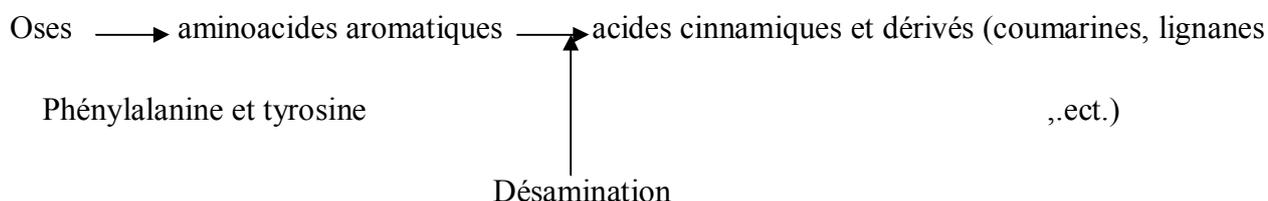
CHAPITRE II
METABOLITES
SECONDAIRES

II.1. Composés phénoliques

D'après (Bruneton, 2009) les composés phénoliques forment un très grand ensemble de substances qui est difficile à définir simplement. L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au un groupe hydroxyle libre ou engagé dans une autre fonction et qui sont des molécules non azotés.

Les composés phénoliques des végétaux sont issus de deux grandes voies d'aromagenèse :

- La voie la plus courante est celle qui, via le shikimate

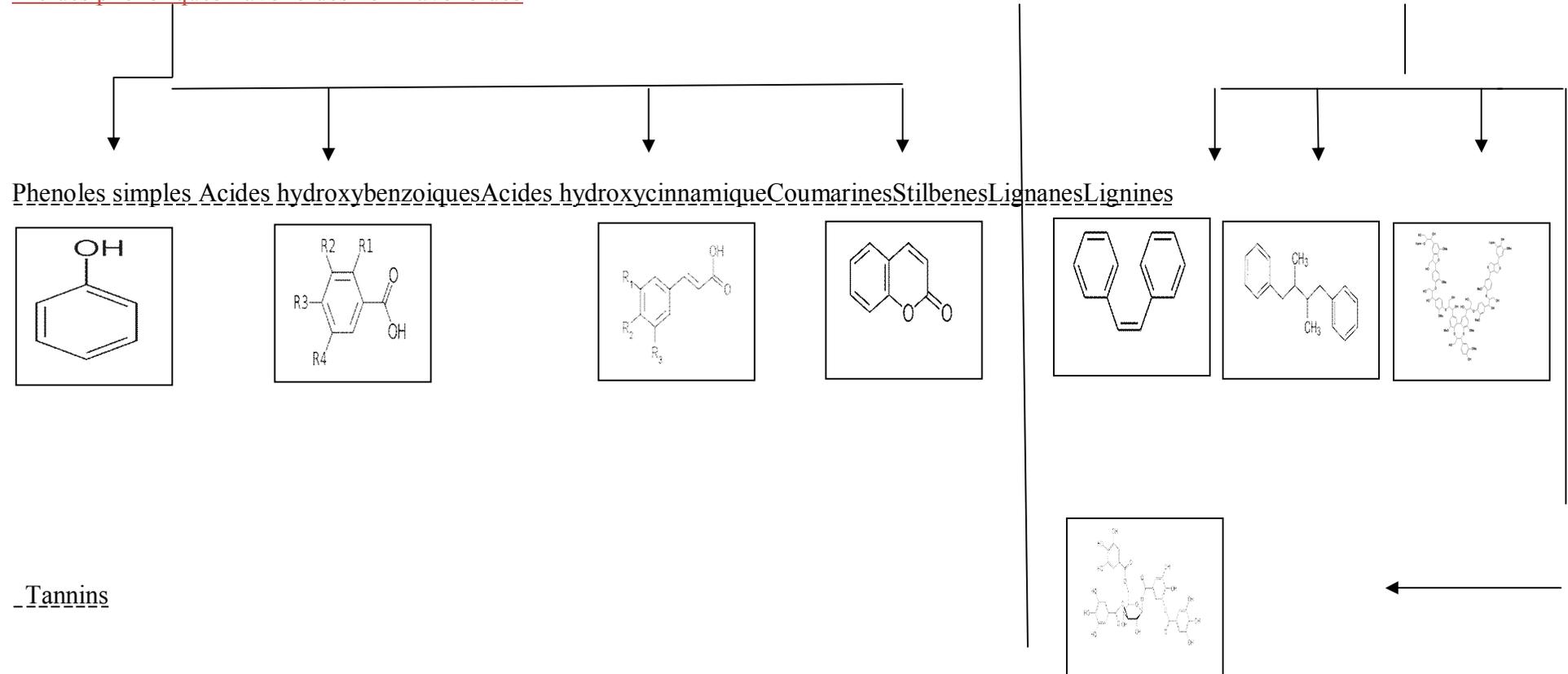


- La voie de l'acétate et conduit à des poly- β -cétoesters de longueur variable qui engendrent, par cyclisation ou condensation aldolique, des composés souvent polycycliques
- Par voie mixte conduit à la formation par exemple de flavonoïdes
- Par la participation d'un troisième synthon élémentaire –le mévalonate- c'est le cas des quinones, pyranocoumarines

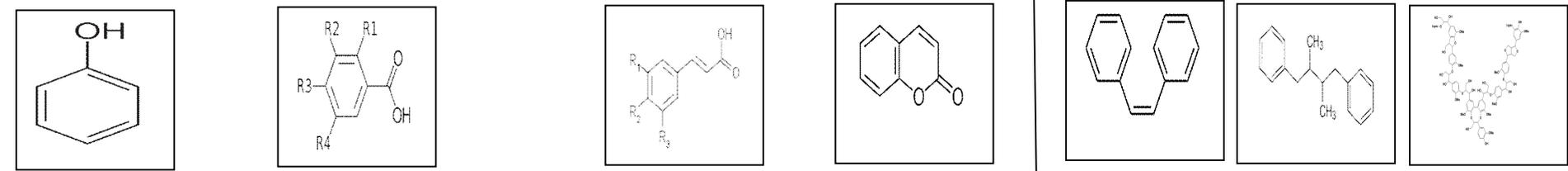
II.2. Les principales classes de composés phénoliques (Jacques et al., 2005).

Composés phénoliques

Acides phénoliques Flavonoïdes Non flavonoïdes

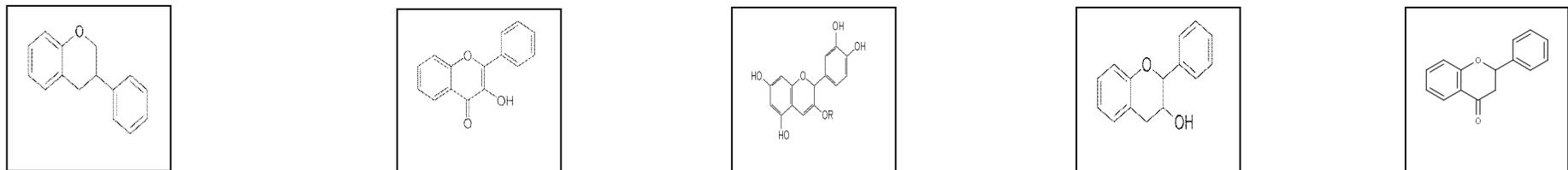


Phénols simples Acides hydroxybenzoïques Acides hydroxycinnamiques Coumarines Stilbènes Lignanes Lignines



Tannins

Isoflavonoïdes Flavonoïdes Anthocyanes Flavanols Flavanones



II.3. Actions biologiques des composés phénoliques

a-Pour le bien de la plante ((Bruneton, 2009)

- Intervention dans les symbioses (kaempférol,...)
- Intervention dans les relations hôte/parasite (lignines, iso flavonoïdes,...)
- Protection contre le rayonnement UV (anthocyanes, tannins,...)

b-Pour le bien de l'humain

Protection contre les maladies liées au vieillissement (Hennebelle et *al.*, 2004) ; leur pouvoirs antioxydants et anxiolytique permettent la protection des granulocytes contre le stress oxydatif (Bouayed et *al.*, 2008).

II.4. Composition d'*Urgineamaritima* en métabolites secondaires

Un travail important a été fait pour déterminer la composition de celle-ci, en molécules photochimiques tel que les stéroïdes, les alcaloïdes, les terpènes etc....

Selon HELLER, 1969 ; Ulrich

et *al.*, 1996 ; la définition et le rôle des différents métabolites secondaires présents dans *U. maritima* sont :

II.4.1. Stéroïdes

*Définition

Substances dérivées d'un stérol (partagent toutes la même structure de base : le noyau stérol). Différents groupements chimiques peuvent se fixer sur le noyau stérol formant ainsi différents stéroïdes.

*Rôle

Les plantes qui contiennent ces composés ont un effet sur l'activité hormonale.

***Composition de la plante**

La composition en stéroïde de cette plante est mentionnée dans le tableau suivant (Singh *et al.*, 2016).

Tableau N°02 : Types de stéroïdes présents dans *U.maritima*.

Molécule	Définition	Structure
Scilliroside	Est un hétéroside d'origine végétale obtenu par extraction de la Scille maritime (variété rouge).	$C_{32}H_{44}O_{12}$
Thevetoside	Est un glycoside cardiaque ; molécule cardiotonique.	$C_{30}H_{44}O_9$
Glucoscalliroside	Glycoside cardiaque, précurseur de vitamine D	$C_{38}H_{54}O_{16}$
Scillirosidin	Est un bufanolide, lactone stéroïde.	$C_{26}H_{34}O_7$
Glucoscalliphaeoside	Stéroïde, glycoside.	$C_{36}H_{52}O_{14}$
Scillirubroside	Cardinolide .	$C_{30}H_{42}O_{10}$

II.4.2.Flavonoïdes***Définition**

Substances caractéristiques de la majorité des plantes qui donnent de la couleur aux fleurs et aux feuilles.

***Rôle**

Possèdent des propriétés : antioxydante, anti-inflammatoire, antivirales et des effets oestrogéniques.

*Composition de la plante

Les types de flavonoïdes qui composent *U. maritima*, sont illustrés dans le tableau suivant (Singh *et al.*, 2016).

Tableau N°03 : Types de flavonoïdes présents dans *U.maritima*.

Molécule	Définition	Structure
Kaempferol	Est un flavonol, pigment jaune peu soluble dans l'eau	$C_{15}H_{10}O_6$
Quercetin	Flavonoïde ,pigment des feuilles et des fruits .et qui renforce la paroi capillaire .	$C_{15}H_{10}O_7$
Taxifolin	dihydroquercétine est un composé organique de la famille des flavanones, un sous-groupe de flavonoïdes	$C_{15}H_{12}O_7$
Vitexin	est un composé chimique de la famille des flavones. C'est plus précisément un hétéroside	$C_{21}H_{20}O_{10}$
Vicenin	est légèrement soluble (dans l'eau) et un composé très faiblement acide .	$C_{26}H_{28}O_{14}$
Isoorientin	homoorientine est un composé chimique de la famille des flavones. C'est plus précisément un hétéroside	$C_{21}H_{20}O_{11}$
Scoparin	matière colorante jaune présente seulement dans les fleurs, plusieurs alcaloïdes, le plus important étant la spartéine	$C_{22}H_{22}O_{11}$

II.4.3. Acides phénoliques

***Définition**

Les phénols sont par définition des substances possédant un cycle aromatique avec au moins une fonction hydroxyde.

***Rôle**

Principalement dans la protection des végétaux contre les champignons pathogènes.

***Composition de la plante**

Les acides phénoliques rencontrés dans cette plante sont représentés dans le tableau N°4, avec leurs structures (Singh *et al.*, 2016).

Tableau N°04 : Types de phénols présents dans *U.maritima*.

Molécule	Définition	Structure
Acide caféique	est un composé organique naturellement présent dans toutes les plantes. L'acide caféique est un intermédiaire clef dans la biosynthèse de la lignine. L'acide caféique est un dérivé de l'acide cinnamique. Il a une structure proche de l'acide férulique et il appartient à la famille des phénylpropanoïdes.	$C_9H_8O_4$
Acide coumarique	acide hydroxycinnamique est un composé phytochimique dérivé de l'acide cinnamique	$C_9H_8O_3$
Cyanide	es cyanures sont les composés de l'anion CN^- , formé d'un atome de carbone lié par une liaison triple à un atome d'azote. L'ion CN^- est	CN^-

	la base conjuguée de l'acide cyanhydrique.	
Pelargonidine	La pélargonidine est un pigment végétal de la famille des anthocyanidols. Elle possède une couleur rouge brun caractéristique et est présente dans de nombreux fruits rouges sous forme glycosylatée.	$C_{15}H_{11}O_5^+$

DEUXIÈME PARTIE

ETUDE

EXPÉRIMENTALE

CHAPITRE I

MATÉRIEL ET

MÉTHODES

I.1. Objectifs du travail

Ce travail vise à :

- Valoriser la flore sauvage de la région de Tiaret.
- Exploiter la plante *Urgineamaritima* comme une nouvelle voie de recherche scientifique et utiliser ses composés bioactifs notamment les polyphénols qui pourront remplacer les composés synthétiques.
- Déterminer l'activité biologique de cette plante ; antioxydante et antimicrobienne (antibactérienne et antifongique).

I.2. Lieu et période de travail

L'étude expérimentale a été réalisée au niveau des laboratoires de technologies alimentaires, biochimie et de microbiologie de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, université Ibn Khaldoun – Tiaret , pendant une période qui s'est étalée entre le 12/02/2018 et le 20/06/2018.

I.3. Matériel

I.3.1 Matériel utilisé au laboratoire

I.3.1.1. Verrerie, appareillage et produits utilisés

Lors de la réalisation de ce travail, nous avons utilisé le matériel et les produits cités dans la tableau suivant,

Tableau N° 05: Liste de verrerie, appareillage et produits utilisés

Verrerie et autres	Appareils	Produits et milieu de culture
Erlenmeyers	Etuve (MEMMERT)	Méthanol pure
Pipettes Pasteur	Autoclave (SANOCLAV)	Eau physiologique 0.9%
Béchers	Rota vapeur (HEIDOLPH)	Eau distillée
Pipettes	Balance (KERN)	Galleries API (20e , NE, Staph)
Tubes à essai	Spectrophotomètre (BiochromLibra S6)	Eau oxygénée
Eprouvettes	Broyeur électrique (IKASTOFAN)	Disques oxydase
Boites de Pétri	Microscope optique (OPTIKA)	King A , B ; ODC, LDC, ADH, Clarck et lubs, schubert cloche,
Ballons	Bec bunsen	Tsi, Citrate Simmon, Mannitol mobilité
Micropipettes	Agitateur (IKAMAG)	Géloses : Mueller Hinton, Cétrimide, Chapman, Mac Conkey, EMB, PDA
Barreaux magnétiques		Lugol, Fuschine, Violet de gentiane
Écouvillons		Réactif Folin-Ciocalteau
Embouts		Fecl3 162.2 g/mol
Disques wattman		Acide acétique glacial 60.05g/mol
Pinces		Acide chlorhydrique 36.461g/mol
Anses de platine		Formol 30.026 g/mol
Lames		Acide sulfurique 98.079 g/mol
Flacons		Alcool isoamilique 88.1482 g/mol
Spatules		Dichloromethane 84.933 g/mol Ether diéthylique 74.1216 g/mol

I.3.2. Matériel biologique

Le matériel biologique utilisé se divise en trois catégories : Matériel végétal, Souches bactériennes et Champignons.

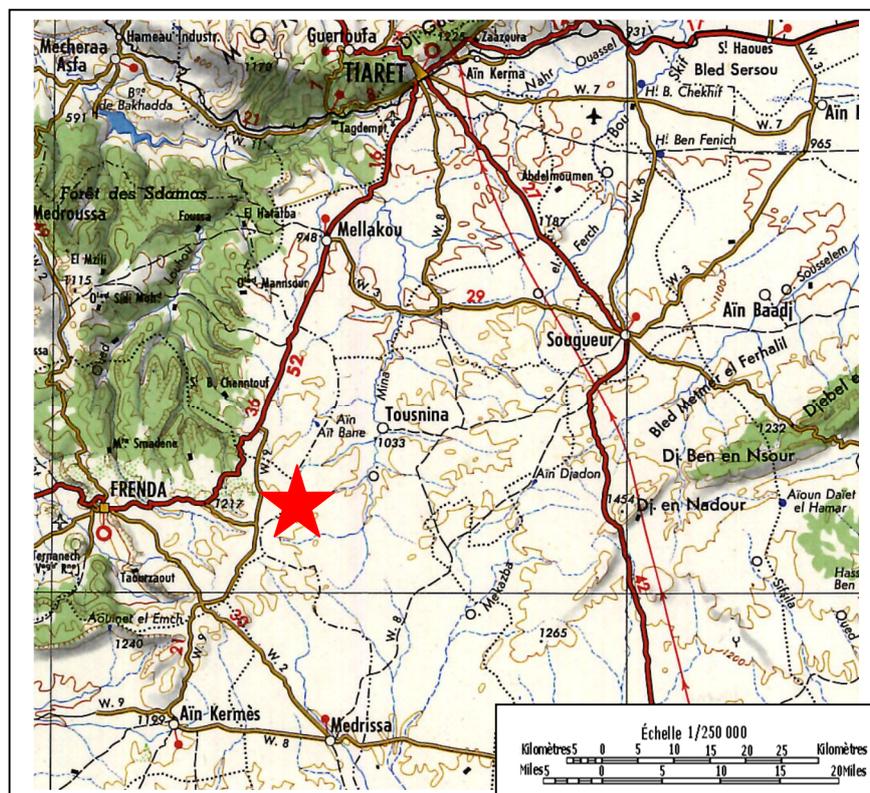
I.3.2.1. Matériel végétal

Une plante sauvage, caractéristique et abondante dans la région de Tiaret a été utilisée, qui est *Urgineamaritima*.

➤ Zone et période de la récolte

La récolte de la plante étudiée, a été réalisée dans la région steppique de la wilaya de Tiaret, à savoir dans la commune de MEDRISSA, dans la station MATROUNIA à environ 15Km sur la route de SOUGUEUR (Figure N°01). Caractérisé par un climat sec et un sol à base céréaliculture, qui favorise le développement de cette plante pendant la période de jachère.

Les bulbes frais *Urgineamaritima* ont été récoltés pendant le mois de février 2018.



★ Zone de récolte d'*Urgineamaritima*

Figure N°04: Situation géographique de la zone de récolte (Matrounia, Medrissa) (Google Earth ,2018).

➤ Identification botanique

La plante étudiée a été identifiée par le botaniste Dr.AIT HAMMOU au niveau de laboratoire d'écologie végétale, département des sciences de nature et de la vie, Université Ibn Khaldoun- Tiaret.

➤ Préparation des échantillons

Les bulbes récoltés ont été nettoyés et séchés à l'air libre, à l'abri de lumière et d'humidité et à une température ambiante pendant 25 jours, puis broyés par un broyeur électrique et tamisés à l'aide d'un tamis 250 μm , afin d'avoir une poudre fine.

Puis la poudre obtenue a été pesée ensuite conservée dans des boîtes hermétiques à l'abri de lumière et à température ambiante jusqu'à son utilisation dans les différentes expérimentations réalisées dans cette étude

I.3.2.2. Souches bactériennes testées

Les bactéries étudiées sont les plus rencontrées comme principale cause de maladies infectieuses. Il s'agit de :

- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

La provenance de ces souches est à partir du laboratoire de microbiologie faculté SNV université d'IBN KHALDOUN.

Ces souches ont été purifiées par repiquage successif, conservées puis standardisées.

I.3.2.3. Champignons testés

Les champignons testés sont :

- *Fusarium oxysporum* 27853 (laboratoire de microbiologie faculté SNV université d'IBN KHALDOUN).
- *Aspergillus niger* (laboratoire de recherche faculté de zaaroura)

I.4. Protocole expérimental

Les différentes étapes du protocole expérimental réalisées sont résumées dans la figure N°03.

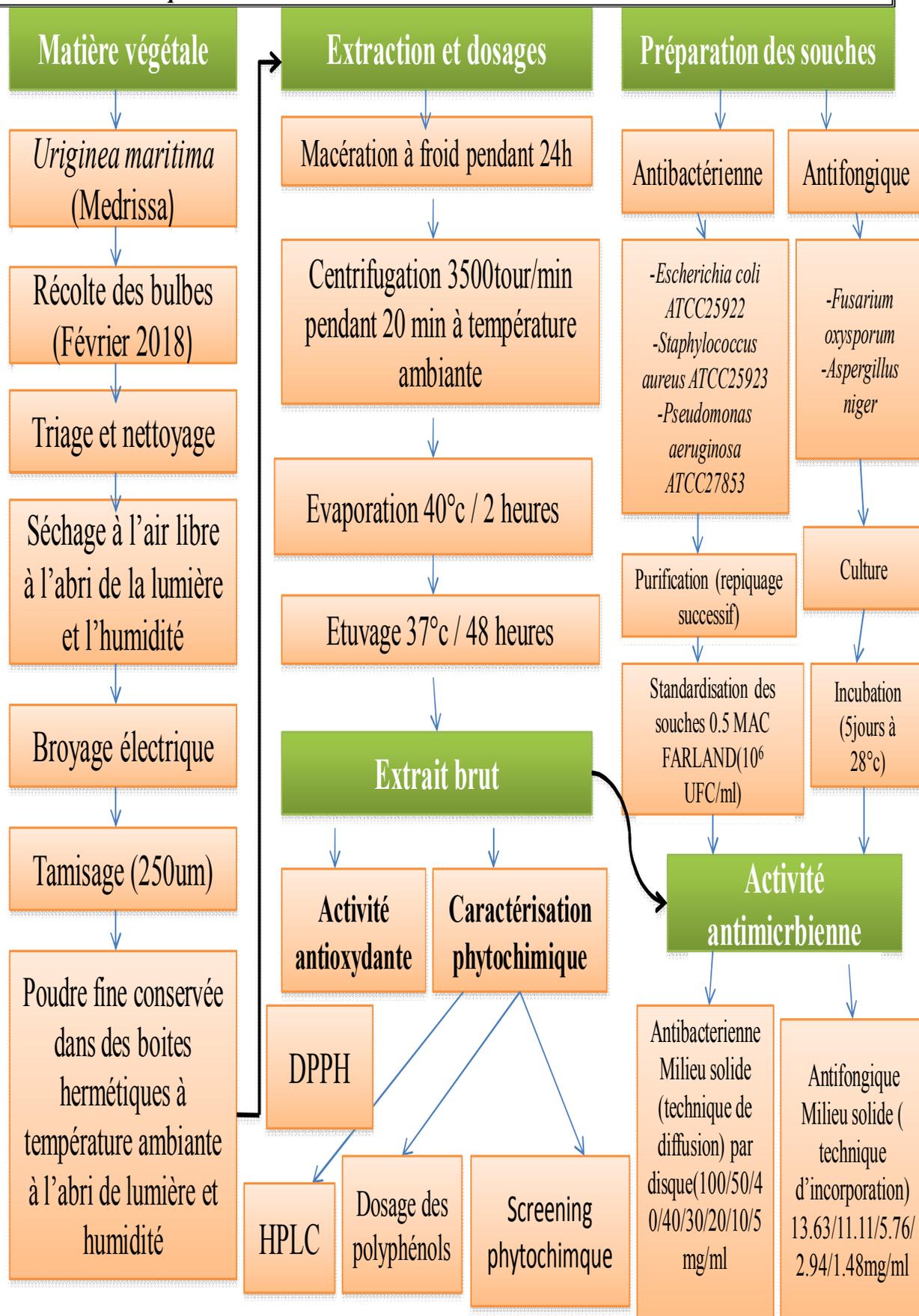


Figure N°06: Organigramme du protocole expérimental.

I.4.1. Extraction et dosage des composés phénoliques

L'extraction des composés phénoliques a été réalisée selon le protocole décrit par Maazounet *al.* (2017) par macération à froid avec l'adaptation de quelques conditions.

I.4.1.1. Extraction méthanolique

Cinq gramme de la poudre obtenue ont été mélangés avec 50 ml du solvant méthanol 80% (1/10 : p/v). Le mélange a été mis à l'agitation pendant 24h puis centrifugé à 3500 tour/mn pendant 20 minutes. Le surnageant a été placé dans le rotavapeur à 40°C en vue de l'élimination du solvant organique seul ensuite l'extrait a été porté à l'étuve à 40°C pendant 48h. Après évaporation totale, l'extrait est pesé pour calculer le rendement massique ensuite la reconstitution est faite dans le solvant approprié qui est le méthanol. L'extrait est conservé à 4°C jusqu'à son utilisation pour les tests visés dans ce travail (Maazoun *etal.*, 2017).

- Le calcul du rendement massique est fait selon la formule suivante (Mohammedi, 2006).

$$\mathbf{R\% = (Masse\ d'extrait\ sec / Masse\ de\ la\ matière\ végétale) \times 100}$$

I.4.2. Dosage des composés phénoliques totaux

Nous avons opté pour le protocole décrit par Singleton et *al.*, 1965 afin de déterminer la teneur en composés phénoliques totaux avec l'utilisation du réactif Folin-Ciocalteu.

I.4.2.1. Principe

Le réactif Folin-Ciocalteu est composé par un mixte d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et phosphomolibdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). Le caractère réducteur des phénols permet de réduire le réactif FC en un mélange de molybdène (MO_8O_{23}) (Yakhlefet *al.*, 2011). Le maximum d'absorption à la longueur d'onde 760nm dont l'intensité de la coloration bleue est proportionnelle aux taux des phénols.

I.4.2.2. Protocole

Les démarches de ce protocole consistent à mélanger 100ul de l'extrait végétal avec 500ul de Folin-Ciocalteu (1/10) et 1000 µl d'eau distillée. A une température ambiante pendant 1 minute le mélange est incubé puis l'ajout de 1500ul de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 20%. Après incubation à température ambiante et à l'obscurité pendant 2h les D.O ont été lues à 760nm. La détermination de

la concentration en composés phénoliques totaux a été faite en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant l'acide gallique comme standard d'étalonnage (Singleton *et al.*, 1965).

I.4.3. Screening phytochimique

C'est une technique qui permet d'identifier différents groupes chimiques contenus dans un organe végétal. Ce sont des réactions physicochimiques qui permettent de confirmer la présence de certains molécules chimiques.

➤ Test pour les hydrates de carbone

Deux ml d'extrait ont été mis dans un tube à essai, 2ml du réactif de Molisch et quelques gouttes d'acide sulfurique concentré ont été ajoutés. La formation de couleur pourpre indique la présence de glucides (Sharma *et al.*, 2017).

➤ Test des tanins

Introduire dans un tube à essai 5 ml d'extrait et ajouter 1 ml de solution aqueuse diluée de $FeCl_3$ à 1%. En présence de tanins, il se développe une coloration verdâtre ou bleu-noirâtre (Sharma *et al.*, 2017).

➤ Test des alcaloïdes

Deux ml d'extrait ont été mis dans un tube à essai, 2ml d'acide chlorhydrique concentré ont été ajoutés. La formation de couleur verte indique la présence des alcaloïdes (Sharma *et al.*, 2017).

➤ Tests des phénols

Un ml d'extrait a été prélevé dans un tube à essai, 2ml d'eau distillée suivie de quelques gouttes de chlorure ferrique à 10% ont été ajoutés. La formation de couleur verte indique la présence de phénols (Sharma *et al.*, 2017).

➤ Test des glycosides cardiaques

Un demi ml d'extrait mis dans un tube à essai, puis l'ajout à ce tube 2ml d'acide acétique glacial et quelques gouttes de solution de chlorure ferrique à 5%, suivie par l'addition de 2ml d'acide sulfurique concentré. La couleur brun-rougeâtre est apparue à la jonction de la couche liquide indique la présence de glycosides cardiaques (Sharma *et al.*, 2017).

➤ **Test de saponosides**

A l'aide d'un erlenmeyer de 250ml, faire une décoction de 1g de poudre dans 100ml d'eau distillée. Chauffer pendant 15 minutes tout en maintenant une ébullition modérée. Filtrer après refroidissement et ajuster à 100ml dans un tube puis agiter pendant 15 secondes à raison de 2 agitations par seconde. Laisser reposer.

➤ **Test des flavonoïdes**

La présence de flavonoïdes a été testée en poudre des bulbes et dans l'extrait organique : 1g de poudre a été ajouté à 10ml de méthanol en utilisant la méthode de réaction à la cyanidine (Diallo *etal.*, 2004) . La coloration rouge ou rose indique la présence de flavonoïdes.

➤ **Test des stérols et terpènes**

Introduire dans un tube à essai 1g de poudre et 20ml d'éther , boucher, agiter et laisser en contact pendant 24h. Après ce temps, filtrer et compléter à 20ml avec de l'éther. Ensuite , réaliser la réaction de Lieberman-burchard qui consiste à évaporer à sec dans une capsule 10ml d'extrait. Dissoudre le résidu dans 1ml d'anhydride acétique avec 1ml de chloroforme et recueillir la solution dans un tube à essai. Ajouter 1à2ml d'acide sulfurique concentré au fond du tube à essai à l'aide d'une pipette et ne pas agiter. La formation d'un anneau rouge-brunâtre ou violet à la zone de contact des deux liquides et la coloration verte ou violette de la couche surnageante révèlent la présence de stérols et de triterpènes(Parekhetal., 2006).

➤ **Mucilages**

Introduire 1ml de d'extrait methanolique à 10% dans un tube à essai et ajouter 5ml d'éther absolu. L'obtention d'un précipité floconneux par mélange après 10 à 15 minutes d'agitation indique la présence de mucilage (Ahmed et *al.*, 1968).

I.4.4.Caractérisation de l'extrait méthanolique par HPLC

La chromatographie sous toutes ses formes, est une méthode de séparation des constituants d'un mélange gazeux, liquide ou solide. C'est une méthode de séparation, donc d'analyse, basée sur les différences d'affinités que peuvent présenter deux ou plusieurs composés pour deux phases, l'une fixe ou stationnaire et l'autre mobile.



Figure N°07 : L'équipement HPLC.

I.4.4.1. Principe

Les substances se répartissent entre deux phases non miscibles, selon un équilibre lié à un coefficient de partition, qui dépend à la fois de la nature des composés et de celle des deux phases considérées;

Le renouvellement continu de la phase mobile remet en cause cet équilibre et entraîne une succession d'autres équilibres, ce qui se traduit par une migration des substances le long de la phase stationnaire;

La séparation est obtenue car chaque composé migre avec une vitesse qui lui est propre (et qui dépend du coefficient de partition).(Augusto F., et al.2000)

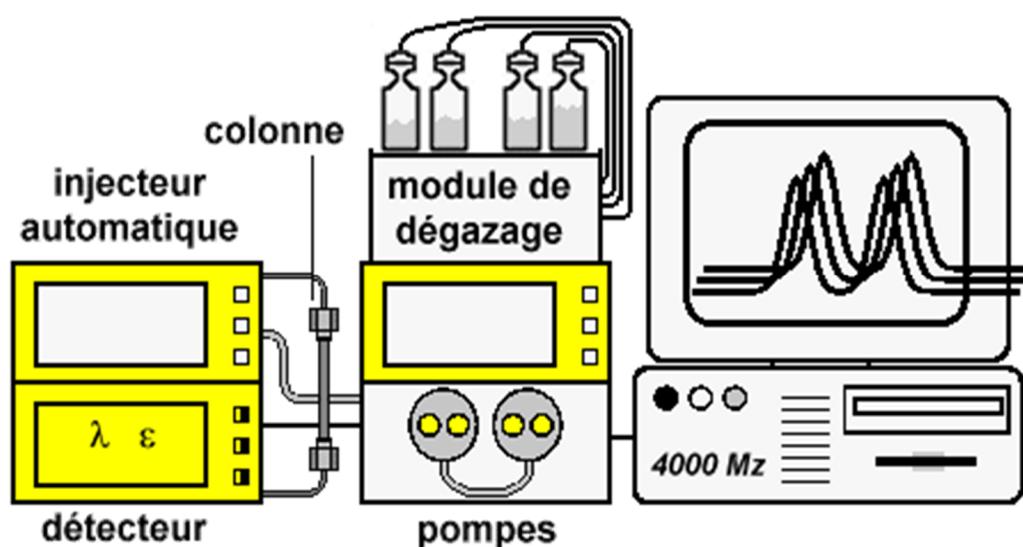


Figure N°08 : Schéma du principe de HPLC.

I.4.4.2. Protocole

La reconstitution de notre extrait a été faite dans le méthanol 80% ; pour assurer la bonne solubilité on a mis la solution dans un bain sonore pendant 5 min puis on injecte la préparation

La méthode utilisée est une méthode optimisée validée le 22/12/2015 par CRAPCBousmail Tipaza.

- Colonne : C 18 /150cm/4.6mm/5µm
- Détection : 254 nm
- Phase mobile ou éluant : H₂O acidifié à 1% Ac.Acétique/MeOH 100%
- Température : 25°
- Débit : 1 ml/min

I.4.5. Détermination de l'activité antioxydante DPPH

Le DPPH est un radical libre stable, de couleur violette et de formule (1,1 Diphényl 2 PycrilHydrazil)

Principe

Le test DPPH° mesure le pouvoir antioxydant d'extraits végétaux (composés phénoliques dans un système modèle (solvant organique, température ambiante) à réduire DPPH° par captation d'une molécule d'H, initialement violet en jaune pâle.

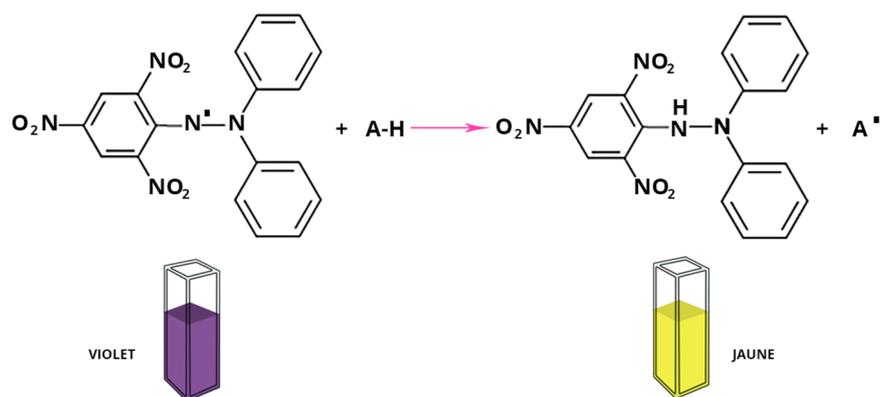


Figure N°09 : Réaction de neutralisation des radicaux libres.

La réduction du DPPH° est effectuée dans certain paramètre et influencée par certains tel que ; le solvant, le pH, la concentration en DPPH, la longueur d'onde et finalement le temps de la réaction (Molyneux ,2004)

Protocole

Extrait : Diverses concentrations ont été utilisées.

DPPH : Solution mère préparée en mélangeant 0.004 g de poudre de DPPH dans 100 ml de MeOH.

Blancs : Meoh +DPPH .

Pour chaque concentration ; 50 µl d'extrait est ajouté a 1.95 ml de DPPH a 0.004 /, pour le blancs 2 ml de solution DPPH. Incubation des préparations pendant 2 h a 37°C et à une température ambiante (trois répétitions ont été effectuées).Le pourcentage de piégeage du radical DPPH est calculé par la formule suivante (Ladohetal., 2014) :

$$\% \text{Piégeage} = \frac{\text{Absorbance contrôle} - \text{Absorbance de l'extrait}}{\text{Absorbance}}$$

II. Ré-identification des souches bactériennes

Des tests macroscopiques et microscopiques ont été réalisés selon Delarras, 2007 afin de ré-identifier les bactéries étudiées (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*).

II.1. Examens macroscopiques

II.1.1. Ensemencement

Ensemencer un milieu gélosé en boîte de Pétri (Chapman pour *S.aureus*, Mac-Conkey pour *E.coli* et Cétrimide pour *P.aeruginosa*) de façon à diviser le fond de la boîte en 4 quadrants numéroter de 1 à 4 après déposer la suspension bactérienne dans le quadrant 1 sur le bord de la boîte et l'étaler en une large strie puis effectuer à l'aide d'une anse de platine flambée des stries serrées sur les quadrants

1 et 2. Répéter cette démarche par des stries perpendiculairement aux précédentes sur les quadrants 2 et 3 puis encore perpendiculairement sur les quadrants 3 et 4.

II.2. Test microscopique

II.2.1. Coloration de Gram(Annexe N°01)

II.3. Tests d'identification biochimique classiques

Un protocole détaillé a été adopté pour assurer la fiabilité du processus de ré-identification des trois souches étudiées ainsi pour garantir leur pureté. Ce protocole consiste à faire des tests communs entre les souches et des tests caractéristiques pour chaque souche bactérienne. Ensuite nous avons opté pour les systèmes d'identification standardisés API spécifiques pour chaque souche (API 20E pour *E.coli*, API 20NE pour *P.aeruginosa*, API Staph pour *S.aureus*)

II.3.1. Tests communs

Les tests d'identification biochimique communs entre les 3 souches testées sont cités ci-dessous.

➤ Test Oxydase

Sur une lame propre et sèche déposer disque pré-imprégné par la réactive oxydase et l'imbiber avec une goutte d'eau distillée. A l'aide d'une anse de platine flambée étaler sur le disque quelques colonies. Le test est positif (Ox+) s'il y a l'apparition immédiate sur le disque une couleur violet foncé puis vire au noir.

➤ Test Catalase

Sur une lame propre et sèche déposer une goutte de H₂O₂ (eau oxygénée) et ajouter l'inoculum bactérien par une anse de platine flambée. Le résultat est immédiat dont l'observation des bulles signifie un dégagement gazeux de dioxygène : catalase+, pas de bulles : catalase- (Garnier et Denis, 2007).

➤ Test ONPG

Dans un tube à essai réaliser une suspension bactérienne par l'eau distillée puis ajouter à l'aide d'une pince flambée un disque imprégné d'ONPG ensuite étuver à 37°C pendant 30 minutes. L'apparition d'une coloration jaune : ONPG+, milieu incolore : ONPG- (Delarras, 2007).

➤ Milieu Mannitol mobilité

La fermentation du mannitol se manifeste par une acidification du milieu qui fait virer l'indicateur de pH au jaune (mannitol+) dans le cas contraire il vire au rouge (mannitol-).

Ensemencer par piqure centrale dans la gélose en culot jusqu'au fond du tube à l'aide d'une anse de platine (fil droit) flambée chargée de suspension bactérienne puis incubé 24h à 37°C. La mobilité est détectée par l'observation d'une turbidité par la diffusion des bactéries à partir de la ligne d'ensemencement vers la périphérie et les bactéries immobiles poussent uniquement le long de la piqure centrale (Delarras,2007).

➤ Réactifs ADH (Arginine dihydrolase), LDC (Lysine décarboxylase), ODC (Ornithine décarboxylase)

Ensemencer en transférant une ou deux colonies à partir d'une culture fraîche en mélangeant pour répartir la culture dans le bouillon puis recouvrir chaque tube avec 1 ml d'huile de paraffine ensuite incubé à 37°C pendant 24h. Le milieu deviendra jaune : bactérie non décarboxylante, le milieu reste violet : bactérie décarboxylante(Notice institut Pasteur d'Algérie).

➤ Test Schubert cloche

S'assurer que la cloche de Durham est exempte d'air ensuite ensemencer en plongeant une anse de platine flambée chargée de suspension de la culture à étudier puis incubé à 37°C pendant 24h(Delarras,2007).

➤ Milieu Urée indole

Le milieu Urée indole est un milieu de culture synthétique qui permet de réaliser en 24h 3 tests biochimiques y compris le test Indole qui interviennent dans la différenciation et/ou l'identification des entérobactéries. Ensemencer par une anse de platine le milieu urée-indole avec quelques colonies de la souche à étudier ensuite incubé pendant 24h à 37°C. La lecture de l'indole se fait par l'ajout de 3 gouttes de réactif de Kovacs s'il y a une coloration rouge en surface (anneau rouge) : Indole+, coloration jaune en surface : Indole – (Delarras, 2007).

➤ Milieu Triple SugarIron (TSI)

Le milieu TSI permet la mise en évidence en 24h l'attaque du glucose, lactose et/ou saccharose ainsi que la production d'hydrogène sulfuré et de gaz. L'inoculation avec une anse de platine bouclée préalablement stérilisée à la flamme par piqure centrale du culot puis continuer avec des stries sur la gélose inclinée. L'incubation se fait à 37°C pendant 24h. Le résultat peut être :

- Un virage de couleur du culot au jaune qui traduit la fermentation du glucose ;
- Une coloration noire, signifie la production d'hydrogène sulfuré(H₂S).

- La présence de bulles de gaz qui signifie la fermentation avec production du gaz ;
- Un virage de couleur de la pente au jaune qui traduit l'utilisation du lactose ou saccharose ou les deux à la fois (Delarras,2007).

➤ **Le milieu Citrate de Simmons**

Ce milieu permet la recherche des bactéries capables d'assimiler le citrate de sodium comme seule source de carbone et d'énergie. Ensemencer la pente par une anse de platine préalablement stérilisée à la flamme chargée de suspension bactérienne en stries longitudinales et parallèles. Etuver à 37°C / 24h. L'observation de culture et virage au bleu du BBT signifie la présence d'une alcalinisation et que la souche est capable d'utiliser le citrate comme seule source de carbone : souche citrate de Simmons+. Le test citrate est dit négatif lorsque les bactéries ne donnent ni culture ni bleuissement.

II.3.2. Tests caractéristiques

- ***Pseudomonas aeruginosa***

a) **Milieux King A, KingB**

Les milieux King A et King B sont utilisés pour mettre en évidence successivement la pyocyanine et la pyoverdine de *Pseudomonas aeruginosa*. Liquéfier les milieux king A et King B, refroidir (44°C), mettre dans des tubes en position inclinée jusqu'à solidification. A l'aide d'une anse de platine flambée, des colonies bien isolées sont prélevées et ensemencées en stries serrées dans chaque tube puis sont placés dans l'étuve à 37°C pendant 3 jours. La pyocyanine verdit le milieu King A et la pyoverdine jaunit le milieu King B (Delarras,2007).

b) **Milieu Clarck et Lubs**

Le milieu Clarck et Lubs est l'appellation d'origine du milieu MR-VP (rouge de méthyle-VogesProskauer). Il permet l'étude des dérivés de l'acide pyruvique en différenciant la fermentation butanediolique et les fermentations d'acides mixtes chez les entérobactéries. Ensemencer le tube de bouillon Clarck et Lubs à l'anse de platine avec la souche bactérienne à étudier. Incuber pendant 24h à 37°C. Après incubation diviser le contenu du tube dans deux tubes à essai stériles, ajouter dans le 1^{er} tube 2 gouttes d'une solution de rouge de méthyle à 0.5% dans l'alcool à 60°. Le test RM est positif à l'observation d'une coloration rouge en milieu acide, le milieu reste incolore : RM-. Dans le 2^{ème} tube ajouter 0.5 ml d'une solution à 6% d'alpha-naphtol dans l'alcool à 90% et 0.5 ml d'une solution aqueuse de potasse à 40% puis agiter fréquemment durant 15 minutes. Le test VP est positif à l'observation d'une couleur rose à rouge en présence de la base et d'un milieu très oxygéné (fortement agité), l'absence de couleur : VP- (Delarras,2007).

- *Escherichia coli*

-Milieu Eosine Methylène-blue (EMB)

Le milieu EMB est un milieu sélectif qui permet l'isolement et la recherche des entérobactéries en bactériologie médicale. Il est composé de deux colorants : l'éosine et le bleu de méthylène qui inhibent les bactéries Gram+. Couler le milieu dans des boîtes Pétri et ensemencer avec la suspension bactérienne ensuite incubé à 37°C pendant 24h. Après incubation les colonies violet foncé présentant un reflet métallique sont lactose et/ou saccharose + : elles correspondent principalement à *E.coli* ; les colonies incolores ou légèrement rosées sont lactose- et saccharose- (WWW.Biokar-diagnostics.fr , consulté le 6/05/2018 à 13h).

-Milieu Clarck et Lubs

Le même protocole que celui décrit dans le paragraphe ci-dessus dans les tests caractéristiques de *Pseudomonasaeruginosa*.

- *Staphylococcus aureus*

-Le BD Mannitol salt agar

Ce milieu est utilisé pour l'isolement sélectif de *S.aureus*. Inoculer au bord de la boîte une faible charge de la suspension bactérienne et strier sur la surface de la gélose et étuver 24h/37°C. Après l'incubation rechercher la présence de colonies de *S.aureus* dont la morphologie est comme suit : colonies de taille moyenne et de couleur jaune, milieu de couleur jaune (WWW.Biokar-diagnostics.fr , consulté le 6/05/2018 à 10 :45h).

II.4. Galeries API

La galerie API (Analytical Profile Index) est un système d'identification qui permet de déterminer un ensemble de résultats (profil biochimique) pour chaque bactérie testée en comparant le profil obtenu aux profils de taxons de la base de données (WWW.microbiologie-médicale.fr., consulté le 9/05/2018 à 13 :19 h).

Les données citées ci-dessus et les protocoles réalisés relatives au système d'identification API sont obtenus à partir du manuel d'utilisation spécifique à chaque type de galerie présent dans la boîte d'emballage.

Nous avons utilisé la galerie API spécifique pour chaque bactérie ; API 20E , API20NE et API STAPH pour *E.coli*, *P.aeruginosa* et *S.aureus* respectivement.

-Protocole

- Préparation de la galerie

Dans une boîte d'incubation répartir environ 5ml d'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide puis placer la galerie dans la boîte d'incubation.

- **Préparation de l'inoculum**

Réaliser une suspension 0.5 Mac Farland en utilisant une culture jeune (24h) et de l'eau physiologique stérile NaCl 0.9%.

- **Inoculation de la galerie**

*Remplir les microtubules par l'inoculum à l'aide d'une micropipette en posant sa pointe sur la cupule et en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant.

* La démarche suivie dans chaque microgalerie :

- API 20NE : Remplir les tubes et non les cupules dans les tests NO₃ jusqu'au PNPG, tubes et cupules des tests GLU à PAC (encadrés) et d'huile de paraffine les cupules des tests soulignés GLU, ADH, URE.

-API 20E : Pour les tests CIT, VP et GEL remplir tube et cupule et pour les tests ADH ,LDC ,ODC ,H₂S ,URE remplir la cupule d'huile de paraffine pour créer une anaérobiose.

-API STAPH : Remplir les tubes et non les cupules à partir du test GLU jusqu'au test NAG ensuite remplir la cupule d'huile de paraffine dans les tests ADH et URE.

*Fermer les boîtes d'incubation et incubé à 37°C pendant 24h.

II.5. Antibiogrammes

L'antibiogramme est un test qui permet de déterminer in vitro la capacité d'inhibition bactérienne exercée par un antibiotique (Benoudaet *al.*,2008).

- **Principe**

L'antibiogramme consiste à déposer à l'aide d'une pince stérile à la surface d'une gélose Mueller Hintonensemencée avec une culture pure de la souche étudiée les disques d'antibiotiques (Delarras, 2007).

Technique

- Préparation d'une suspension

Réaliser une suspension dont la concentration doit être équivalente à 0.5 Mac Farland. A l'aide d'une anse de platine flambée on prélève une colonie bien isolée à partir d'une culture jeune (24h) puis on décharge l'anse dans un tube à essai qui contient de l'eau physiologique.

- Ensemencement

L'ensemencement doit se faire dans les 15 min qui suivent la préparation de l'inoculum. Il est réalisé par le trempage d'un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne ensuite le décharger au maximum en l'essorant. Enfin, frotter l'écouvillon sur la totalité de la gélose de la boîte de Pétri. Nous

répétons ce processus deux fois en tournant la boîte 60° à chaque fois en pivotant l'écouvillon sur lui-même. L'ensemencement est achevé en passant l'écouvillon sur le périphérique de la surface gélosée.

- Dépôt des disques

Les disques sont déposés à l'aide d'une pince stérile et doivent être parfaitement appliqués à plat sans glissement. Pour que les zones d'inhibition ne se chevauchent pas, une distance doit séparer un disque périphérique au bord de la boîte et deux disques doivent être éloignés.

Les antibiotiques utilisés pour chaque souche :

- *Escherichia coli* :

CN500 (Céphalexine 500ug)

CAZ30 (Ceftazidime 30ug)

IPM10 (Imipénème 10ug)

- *Staphylococcus aureus* :

GEN50 (Gentamicine 50ug)

TE30 (Tétracycline 30ug)

CX30 (Céfuroxime 30ug)

OX1 (Oxacilline 1ug)

K1000 (Kanamycine 1000ug)

FA10 (Acide fusidique 10ug)

TGC15 (Tigecycline 15ug)

E15 (Erythromycine 15ug)

TEC30 (Teicoplanine)

P10 (Pénicilline G 10ug)

- *Pseudomonas aeruginosa*

CN500 (Céphalexine 500ug)

TIC75 (Ticarcilline 75ug)

CAZ30 (Ceftazidime 30ug)

IPM10 (Imipénème 10ug)

-Incubation et lecture

L'incubation se fait à 37°C pendant 24h, la lecture s'effectue en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition de chaque disque d'antibiotique à l'aide d'une règle, puis de comparer aux valeurs critiques. La mesure de ces diamètres permet de classer la bactérie en 3 catégories :

Sensible (S)

Intermédiaire (I)

Résistant (R)

III. Activité antibactérienne

III.1. Evaluation de l'effet antibactérien de l'extrait méthanolique sur les souches étudiées

La méthode optée pour l'évaluation du pouvoir antibactérien des extraits de plantes sur différents types de milieux mais la plus simple et reproductible est réalisée sur milieu solide (Senouci et abdeouahid,2010).

➤ Protocole

- Réaliser la technique de diffusion sur gélose Mueller Hinton
- Standardiser des souches 0.5 Mac Farland (0.085 à 625 nm) et placer la suspension dans un écouvillon stérile
- Ensemencer les boîtes d'une manière à recouvrir toute la surface et laisser 15 mn.
- Dans chaque boîte déposer un disque d'antibiotique qui sert de témoin positif et un disque de papier wattman de diamètre de 6mm imprégné de 40ul d'extrait à différentes concentrations et pour chaque concentration l'opération est réalisée en trois répétitions.
- Le témoin négatif est fait par le méthanol
- Une boîte vierge pour contrôler la stérilité de l'environnement de travail (témoin de la paille).

*Les concentrations utilisées sont : 100mg/ml ,50mg/ml ,40mg/ml ,30mg/ml ,20mg/ml ,10mg/ml ,5mg/ml.

-Incubation 24h à 37C.

III.2. Evaluation de l'effet antifongique de l'extrait méthanolique sur les souches étudiées

Le test d'activité antifongique a été réalisé selon la technique d'incorporation qui a été décrite par (GROVER *et al.*,1962)

Pour des cultures jeunes les deux espèces fongiques ont été repiquées et laissées pousser pendant 6 jours.

Cette technique exige l'introduction aseptiquement dans des flacons de 150 ml de PDA stérile des volumes d'extraits après la filtration (méthode de stérilisation à froid) :15 ml ,12 ml ,6 ml ,3ml et 1.5 ml d'une manière à avoir des concentrations différentes ; 13.63 mg/ml ,11.11 mg/ml, 5.76 mg/ml ,2.94 mg/ml et 1.48 mg/ml respectivement.

Au milieu de chaque boîte déposer un disque de champignon pour chaque concentration et champignon et réaliser trois répétitions.

Température d'incubation : **28 °C**

Durée d'incubation : **6 jours**

La fongitoxicité est mesurée par le calcul du pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne, selon la formule suivante :

$$IP / = (1-(Dc \text{ ex}/Dt)) * 100 \text{ décrite par Rapilly ,1968}$$

IP : pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne.

Dc ex : diamètre de croissance mycélienne dans une concentration donnée.

Dt : diamètre de la croissance du mycélium témoin.

CHAPITRE II

RÉSULTATS ET

DISCUSSION

II.1. Rendement de l'extrait méthanolique

Le rendement a été calculé à deux reprises :

Matière végétale sèche : 50 g.

Poids d'extrait brut (1) : 15.91 g.

Poids d'extrait brut (2) : 17.1g.

$$R = 33.01 \pm 0.84\%$$

Le résultat de l'extraction des composés phénoliques par la méthode de macération à froid des deux répétitions ($33.01 \pm 0.84\%$) est très important par rapport à celui de Maazoun *et al.*,2017 qui représente 12%. Ce résultat est peut être du à :

- La période de récolte
- Le climat
- La région
- Les conditions de traitement de l'échantillon.

II.2. Dosage des polyphénols totaux

Les résultats du dosage des polyphénols totaux sont représentés dans la figure N°04.

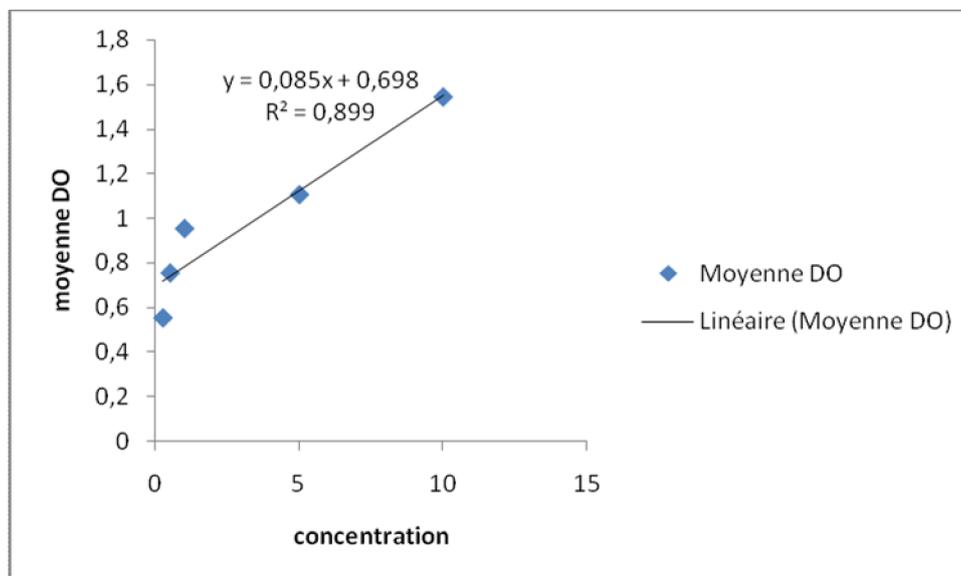


Figure N°10: L'absorbance de l'extrait d'*U.maritima* en polyphénols en fonction des concentrations.

Les analyses quantitatives de polyphénols totaux ont été déterminées à partir de l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage, tracée en utilisant l'acide gallique comme standard.

Cette courbe est établie avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0.998$ ($y = 0.01x - 0.222$). Les valeurs obtenues sont exprimées en mg.EAG/g MS .

La courbe montre une linéarité de l'absorbance en fonction des concentrations de l'extrait utilisé.

La teneur en polyphénols totaux de l'extrait hydrométhanolique d'*Urginea maritima* est moyennement de $279,50 \pm 99,55$ mg EAC/g de matière sèche. Le taux de polyphénols trouvé est relativement faible par rapport à celui de Belhaddad et al., 2017 avec un résultat de 318.09 ± 0.44 mg EAC/g de matière sèche.

En comparant avec celui de Maazoun et al., 2017, dont la teneur moyenne est de 130.88 ± 0.44 mg EAC/g de matière sèche, ce résultat est beaucoup plus inférieur.

D'après cette étude et les études antérieures, on observe une différence dans les résultats des expériences faites sur le même organe de la même plante cela peut dépendre de nombreux facteurs :

- Le solvant d'extrait : la polarité du solvant d'extraction influe sur la teneur en molécules phénoliques (solubilité).
- Facteurs climatiques et environnementaux : la zone géographique, sécheresse, sol, agressions et maladies, etc
- Le patrimoine génétique, la période de la récolte et le stade de développement de la plante
- La méthode d'extraction et la méthode de quantification peuvent également influencer l'estimation de la teneur des phénols totaux
- La faible spécificité du réactif Folin-Ciocalteu qui dose les polyphénols ainsi que les sucres et les protéines.

II.3. Screening phytochimique

Le tableau cité ci-dessus résume l'ensemble des résultats des tests de criblage phytochimique de l'extrait hydro-méthanolique de la plante étudiée.

Tableau N°06: Résultats des tests de criblage phytochimique.

Test	Résultat
Hydrates de carbone	+++
Alcaloïdes	++
Phénols	+++
Flavonoïdes	++
Tanin	+
Mucilage	+++
Saponosides	+++
Glycosides cardiaques	+++
Stérols et terpènes	+

+++ : Fortement positif ++ : Moyennement positif + : Faiblement positif - : Négatif

D'après les tests colorimétriques effectués sur l'extrait hydrométhanolique d'*Urginea maritima* est riche en : hydrates de carbone, phénols, mucilage, saponosides et glycosides cardiaques. La teneur en : alcaloïdes et flavonoïdes est moyenne. Cet extrait contient peu de : tanins, stérols et terpènes.

II.4. Caractérisation par HPLC

L'analyse qualitative de l'extrait hydrométhanolique d'*U.maritima* par HPLC a révélé les résultats décrits dans la figure N°11 et le tableau N°07.

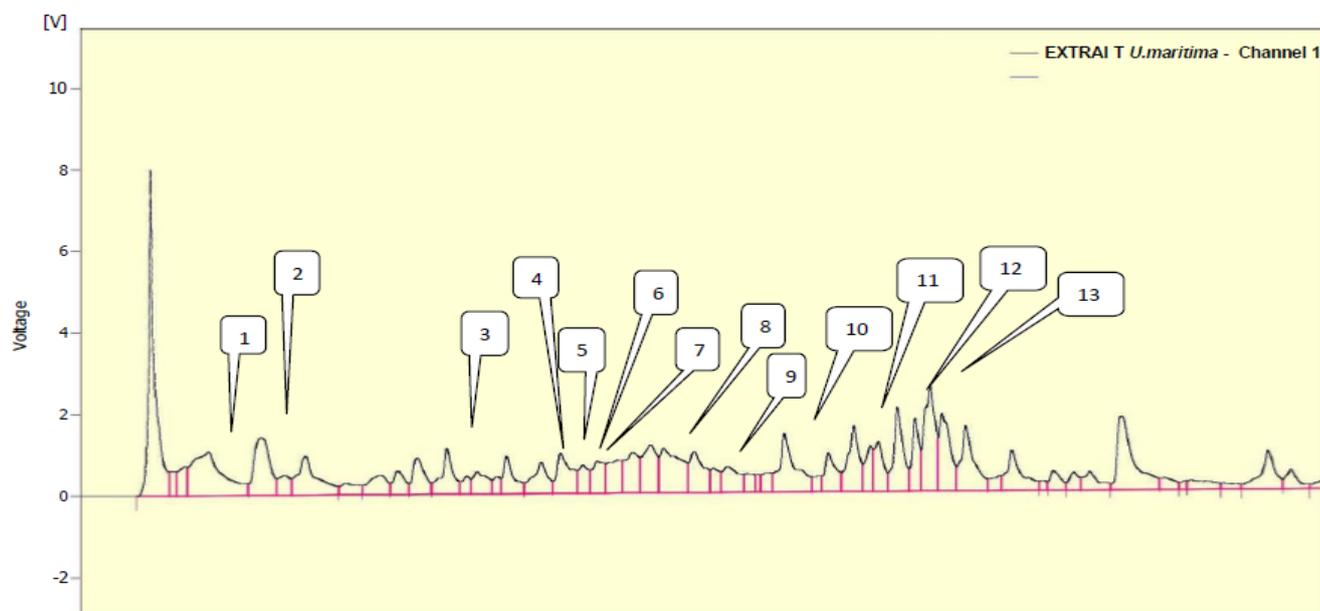


Figure N° 11 : Chromatogramme des pic de base de l'extrait hydrométhanolique d'*Urginea maritima* 1 : Acide gallique .2 :Resorcinol.3 : Acide cafféique.4 : Epicatechin.5 : Acide vanillique 6 :Berberine. 7 : Acide coumarique.8 :Acide 3hydroxy 4etoxycianique .9 :Rutine.10 : Euleropeine.11 : Quercitine. 13 : Myricetin.14 : Kaempferol .

Tableau N° 07 : Affectations de pointe pour les composés identifiés dans l'extrait de bulbes d'*Urginea maritima* par HPLC.

Reten.Time[min]	Area [mV.s]	Height[mV]	Area[%]	Resolution[-]	Symmetry/Tailing [-]	Formule moléculaire	Identification
1	6,187	3778,799	35,958	5,3	0,609	C ₇ H ₆ O ₅	Acide gallique
2	10,907	2146,008	31,729	3	0,772	C ₆ H ₆ O ₂	Resorcinol
3	20,19	351,824	14,381	14,381	0,5	C ₈ H ₇ O ₄	Acide caféique
4	22,323	1274,566	25,596	1,8	1,475	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	Epicatchin
5	23,257	1559,636	32,91	2,2	0,581	C ₈ H ₈ O ₄	Acide vanillique
6	24,337	795,763	22,968	1,1	0,772	C ₂₀ H ₁₈ NO ₄ ⁺	Berberine
7	25,06	1072,947	26,222	1,5	0,613	C ₉ H ₈ O ₃	Acide coumarique
8	28,26	2540,37	36,475	3,6	0,325	C ₆ H ₁₂ O ₃	Acide 3hydroxy4etoxytianique v
9	30,69	580,38	19,918	0,8	0,709	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	Rutine
10	32,317	500,282	15,334	0,7	0,667		Euleropine
11	36,227	1215,166	31,965	1,7	0,358	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	Quercitine
12	38,677	1227,666	40,543	1,7	0,461	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	Myricetin
13	41,187	3150,357	86,323	4,4	0,78	C ₁₇ H ₁₀ O ₆	Kaempferol

L'identification provisoire des composés phénoliques de l'extrait de bulbes d'*Urginea maritima* par HPLC a révélé la présence de 13 composés phénoliques. Des acides phénoliques, flavonoïdes et Stiblene ont été caractérisés (Tableau N° 07).

Le chromatogramme de pic de base (BPC) obtenu a été illustré sur la Figure N°11.

Les composés phénoliques ont été identifiés sur la base de leur temps de rétention. composé au temps de rétention de 6.187 min est l'acide gallique, 10,907 min Resorcinol, 20,19min Acide caféique, 22,323 min Epicatchin, 23,257min Acide vanillique, 24,337 min Acide 3-hydroxy4etoxytianique-v, 25.06min Rutine, 28,26min Acide 3-hydroxy4etoxytianique v, 30,69min Rutine, avec quatre pic majoritaire qui sont obtenus dans les T_R 32,317min, 36,227min, 38,677min, 41,187min; Euleropine, Quercitine, Myricetin, Kaempferol respectivement.

Ces résultats sont presque identiques aux résultats de Maazoun et al., 2017. avec une simple différence peut être due à la base de donnée de l'HPLC de CRAPC car il y'a des pic majoritaires qui sont pas identifiés.

II.5. Détermination de l'activité antioxydante par DPPH

Le graphe cité ci-dessus montre la capacité de piégeage des radicaux libres d'*U. maritima*

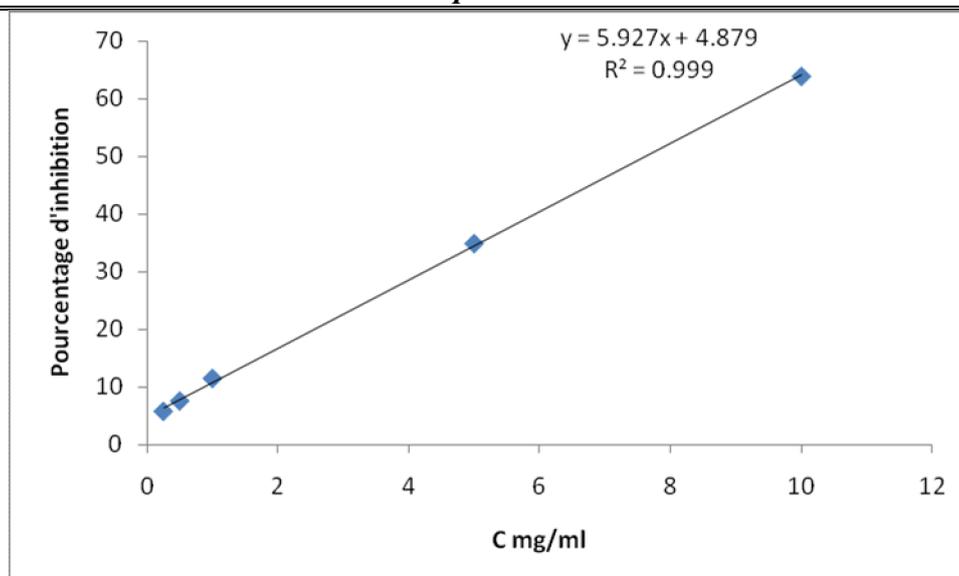


Figure N°12 : L'activité antioxydante de l'extrait brut par la méthode de DPPH.

L'activité antiradicalaire de l'extrait est donc relativement dépendante de la teneur en polyphénols totaux et en flavonoïde. L'extrait méthanolique possède l'effet scavenger avec une valeur d' IC_{50} égale $271,018 \pm 26,30 \mu\text{g/ml}$ Eq Acide ascorbique / 100mg de matière sèche.

Si on compare le résultat obtenu avec le résultat de Belhaddad et *al.*, 2017 avec un rendement de $499.23 \pm 1.25 \mu\text{g/ml}$ Eq A A / 100mg de matière sèche, on dit que la plante de notre région a un pouvoir antioxydant moyen.

II.6. Résultats de la ré-identification bactérienne (Annexe N°02)

Les résultats des tests de galeries API sont mentionnés dans Annexe N°3.

II.7. Résultats de l'activité antibactérienne

Les résultats de l'activité antibactérienne sont représentés dans le tableau N°08

Tableau N°08: Diamètre (mm) de zone d'inhibition de la croissance des trois souches bactériennes

Concentrations g/ml	Escherichia coli mm	Staphylococcus aureus mm	Pseudomonas aeruginosa mm
100	21.66±43.46	25.33±37.45	17.66±36.44
50	16.66±20.77	18.33±17.88	12±17.46
40	13.66±16.32	16.66±14.06	9±13.92
30	14±11.90	13.66±10.33	7±10.30
20	11.66±7.83	11.33±6.82	3.33±7.28
10	8.66±4.14	10±3.83	4±3.72
5	4.66±4.14	9.66±2.88	2.33±2.53
Methanol	1	4	R

Les résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait hydrométhanolique des bulbes d'*U.maritima* sont indiqués dans le tableau *. On voit qu'il y'a une différence qui dépend de la souche et de la concentration de l'extrait appliqué. Le pouvoir inhibiteur de l'extrait montre une action comparable à celle des médicaments antimicrobiens du marché.

Notre étude a été portée sur des bactéries Gram+ *S.aureus* et Gram – *E.coli* et *P.aeruginosa*, dont la zone d'inhibition varie entre 26 et 3 mm.

En comparant nos résultats à ceux des études antérieures, on constate qu'il y'a une différence minime avec les résultats de Zahraa A *et al.*,2016, qui est peut être due au solvant d'extraction car la composition en molécules bioactives dépend du solvant d'extraction utilisé. Si on les compare avec les résultats de Maher O *et al.*,2018, on remarque que nos résultats sont beaucoup plus intéressants; on dit que la différence est peut être liée à l'organe utilisé (bulbe /fruit).

L'action de l'extrait sur les bactéries testées est nettement distincte. Il est plus puissant et actif sur *S. aureus* qui est une Gram + a *P.aeruginosa* et *E.coli* qui sont des Gram- cette différence qui

est peut être due à la constitution de la paroi cellulaire des bactéries, car les gram-négatifs possèdent une double membrane phospholipidique jouant un rôle de protection et en second lieu c'est du à la composition cellulaire.

II.8. Résultats de l'activité antifongique

Les résultats l'activité antifongique de l'extrait testé sur *F. oxysporum* et *A. niger* sont exprimés en détails dans les graphes et les tableaux décrits ci-dessous.

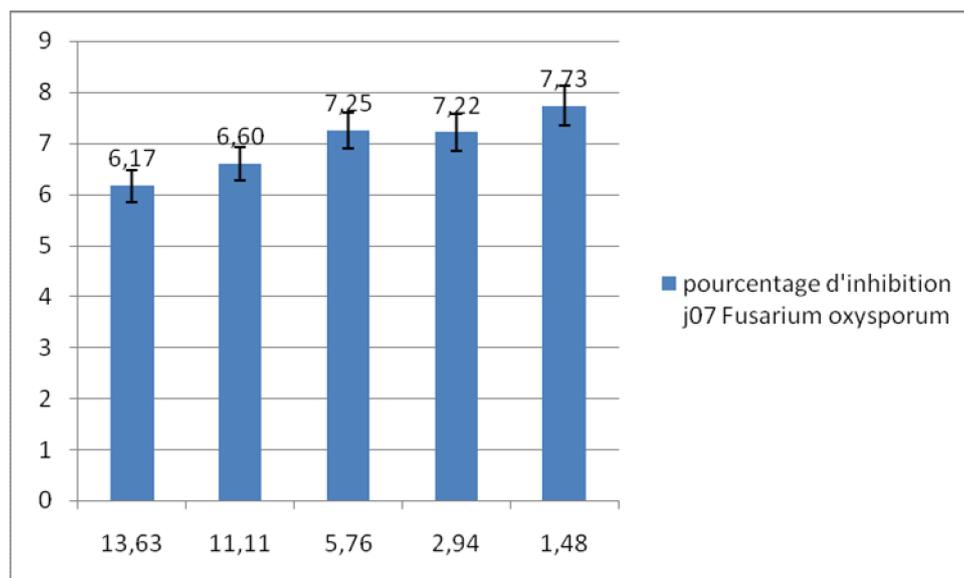


Figure N°13 : Effet de l'extrait méthanolique d' *U.maritima* sur le développement de *F.oxysporum* dans le 7^{ème} jour.

La figure N°13 représente un graphe des % d'inhibition de *F.oxysporum* par les différentes concentrations de l'extrait hydrométhanolique d' *U.maritima* du 7^{ème} jour dans lequel on observe une augmentation progressive dépendante de la concentration.

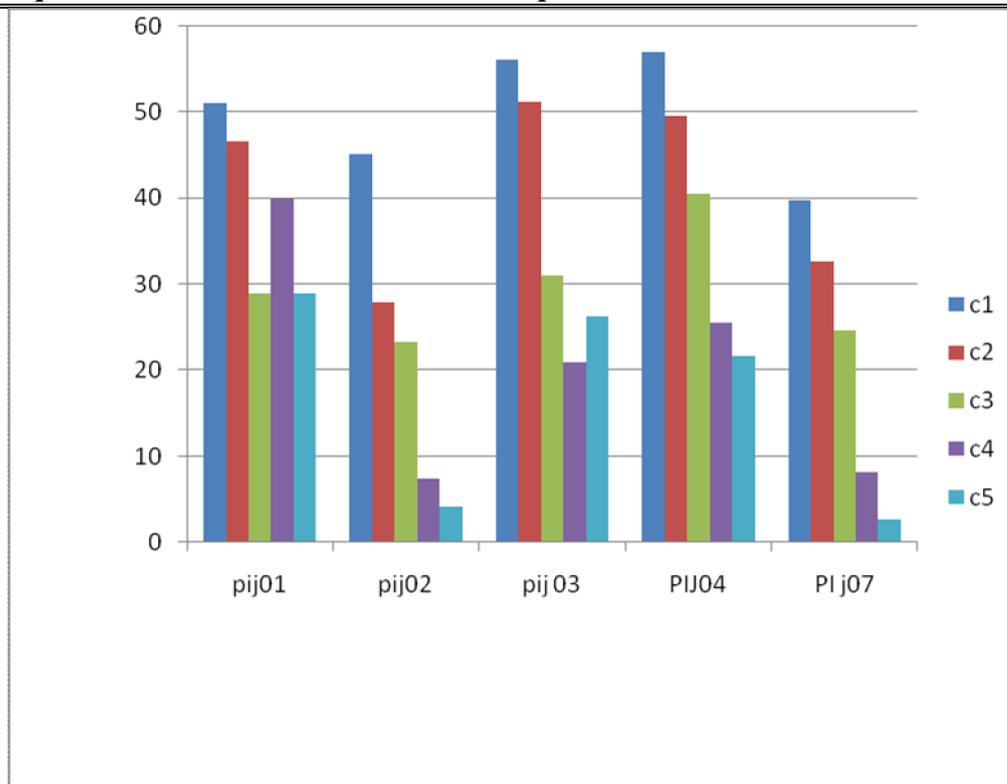


Figure N°14: Effet de l'extrait méthanolique d' *U.maritima* sur le développemnt de *F.oxysporum* au cours de la semaine.

La figure N°14 représente un graphe des % d'inhibition de *F.oxysporum* par les différentes concentrations de l'extrait hydromethanolique d'*U.maritima* au cours de la semaine ou l'on observe une diminution du % d'inhibition au cours de la semaine pour chaque concentration.

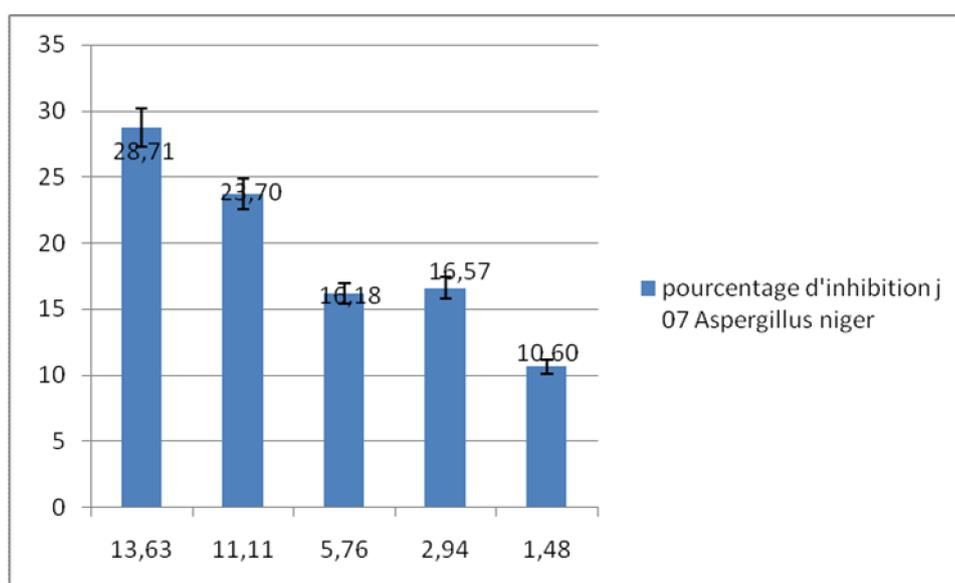


Figure N°15: Effet de l'extrait méthanolique d' *U.maritima* sur le développemnt d'*A.niger* dans le 7^{ème} jour.

La figure N°15 représente un graphe des % d'inhibition de *A.niger* par les différentes concentrations de l'extrait hydrométhanolique d' *U.maritima* du 7^{ème} jour dans lequel on observe une diminution progressive dépendante de la concentration.

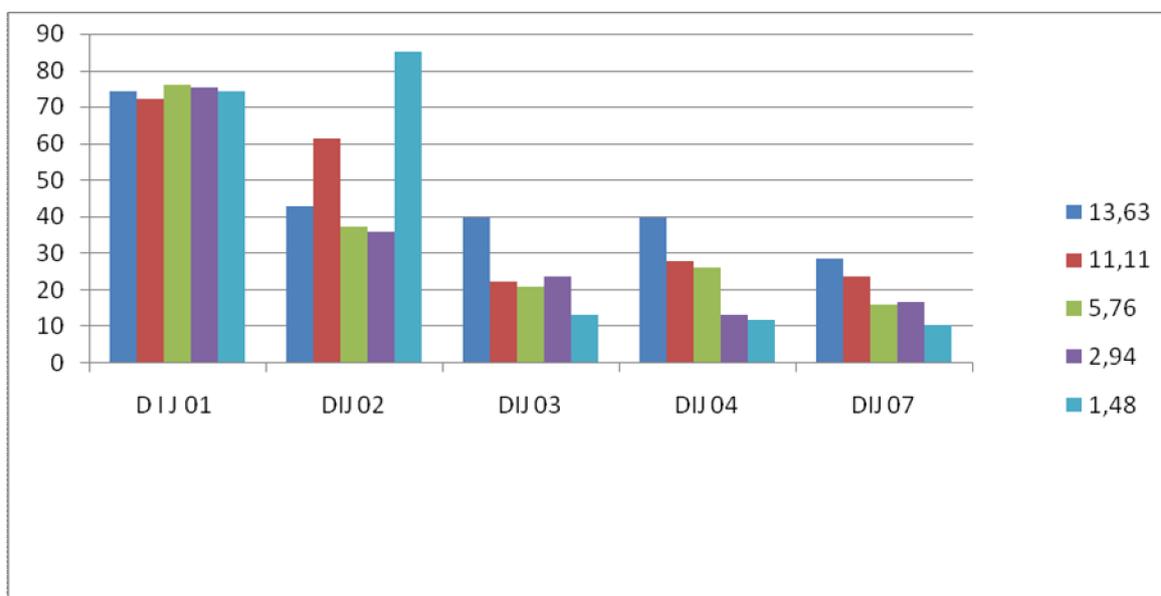


Figure N°16: Effet de l'extrait méthanolique d' *U. maritima* sur le développement d' *A.niger* au cours de la semaine.

La figure N°16 représente le graphe des % d'inhibition de *A.niger* par les différentes concentrations de l'extrait hydrométhanolique d' *U. maritima* au cours de la semaine ou l' on observe une diminution du % d'inhibition au cours de la semaine pour chaque concentration mais dans le jour 1, on observe que l'évolution est stable.

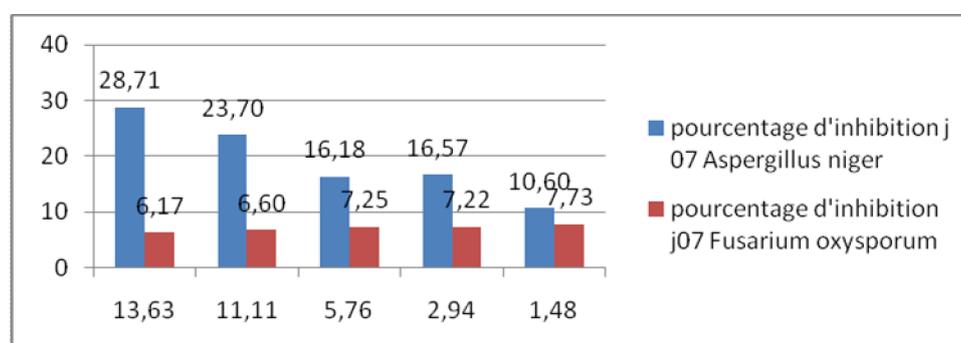


Figure N°17: Comparaison de l'effet de l'extrait méthanolique d' *Urginea maritima* sur le développement de *F.oxysporum* et *A.niger* dans le 7^{ème} jour.

La figure N°17 représente une étude comparative de l'action d'*U.maritima* sur les deux espèces fongiques testées.

Les résultats de l'activité antifongique de l'extrait d' *U.maritima* testé sur les deux espèces fongiques *F.oxysporum* et *A.niger* présente une action remarquable avec un pourcentage de 6.16 ± 0.61 et 28.70 ± 7.08 respectivement pour la concentration C1=13.63mg/ml, qui est un résultat nettement contradictoire avec celui de Daoudi et al., 2017 qui ont obtenu un résultats 19.25 ± 0.64 pour la concentration la plus élevée (C1) et qui n'a aucune activité sur *A.niger*. L'étude comparative montre que l'extrait est beaucoup plus puissant sur *A.niger* que sur *F.oxysporum*.

En comparant ces résultats avec l'action des bactéries mycopathogenes *Bacillus thuringiensis* et *Bacillus licheniformis* productrices de la chitinase qui a une action antifongique puissante.

Tableau N°09 : Tableau comparatif de l'effet antifongique exercée par les bactéries *Bacillus thuringiensis* et *Bacillus licheniformis* productrices de la chitinase et par l'extrait méthanolique d'*U.maritima*.

	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Action sans chitinase	20.20 ± 0.02	15.5 ± 0.02
Action avec <i>B.thuringiensis</i> chitinase	46.66 ± 0.0	80.80 ± 0.02
Action avec <i>B.licheniformis</i> chitinase	30.30 ± 1.21	70.75 ± 0.01
Action de l'extrait d' <i>U.maritima</i>	6.16 ± 0.61	28.70 ± 7.08

Ce résultat montre que l'activité antifongique de l'extrait est beaucoup plus inférieure par rapport à celle exercée par les bactéries mycopathogenes (antagonisme).

Par rapport aux huiles essentielles la lecture d'après Soro *et al.*,2011 se fait selon les critères suivants :

- Très actif, lorsqu'il possède une inhibition comprise entre 75 et 100 %, la souche fongique est dite très sensible

- Actif, lorsqu'il possède une inhibition comprise entre 50 et 75 %, la souche fongique est dite sensible
- Moyennement actif, lorsqu'il possède une inhibition comprise entre 25 et 50 %, la souche est dite limite
- Peu ou pas actif, lorsqu'il possède une inhibition comprise entre 0 et 25 %, la souche est dite peu sensible ou résistante.

Pour *F.oxysporum* la souche est peu sensible ou résistante pour toutes les concentrations alors que *A.niger* est moyennement sensible pour C1 ou dite souche limite et peu sensible ou résistante pour les autres concentrations.

L'effet antifongique de l'extrait hydrométhanolique d'*Urginea maritima* est du à une glycoprotéine présente dans la paroi cellulaire des bulbes et non pas polyphénols de cette plante d'après les études de Deepak *et al.*,2003.

CONCLUSION

Conclusion

Actuellement la Phytothérapie est reconnue comme une médecine à part entière. La science a progressée de manière à développer de nouvelles méthodes scientifiques de pointe pour connaître et analyser avec précision les principes actifs majeurs contenus dans les plantes et prouver leur efficacité réelle par de nombreuses études cliniques.

Avec moins d'effets secondaires et d'actions douces, efficaces et durables, les plantes tendent à remplacer les médicaments synthétiques tels que les antibiotiques (considérés comme la solution quasi universelle aux infections graves).

Les extraits naturels de plantes ont suscité beaucoup d'intérêt scientifique du au fait qu'ils présentent une source inépuisable de molécules biologiquement actives.

Dans ce travail, on s'est focalisé sur l'étude de l'effet biologique (antibactérien, antifongique et antioxydant) de l'extrait hydrométhanolique des bulbes d'*Urginea maritima* ainsi l'étude de sa composition chimique par caractérisation avec HPLC et par criblage phytochimique.

L'extraction des composés phénoliques par la méthode de macération nous a permis de déterminer le rendement de l'extrait à 2 reprises (31.82% et 34.2%), et la quantification du taux de polyphénols totaux ($279,50 \pm 99,55$ mg Eq AG/g d'extrait)). Le criblage phytochimique de la matière végétale et de l'extrait, nous a permis de confirmer la présence des tanins et des flavonoïdes.

L'analyse de la composition chimique par HPLC de l'extrait testé a montrée qu'il est principalement composé d'acides phénoliques et flavonoïdes.

Concernant l'activité antioxydante. Nous avons étudié le pouvoir antioxydant par la capacité de piégeage du radical DPPH où les résultats de cette technique montre que cette plante possède une activité antioxydante avec $IC_{50} = 271,01 \pm 26,30$ μ g/ml eq Acide ascorbique par 100mg de matière sèche.

L'évaluation de l'activité antibactérienne et l'activité antifongique a été faite par la technique de diffusion et la technique d'incorporation respectivement. Les résultats obtenus ont montré une bonne activité antimicrobienne qui est liée à la richesse de l'extrait hydrométhanolique d'*Urginea maritima* en molécules bioactives.

Il serait intéressant de développer les axes de recherche dans ce domaine afin de créer de nouvelles molécules plus efficaces et qui causent moins d'effets secondaires par rapport à la chimiothérapie dont son utilisation a plusieurs répercussions indésirables sur l'organisme humain.

RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

1. **AASIM M, KHAWAR K.M, OZCAN S (2008).** In vitro regeneration of red squill *Urginea Maritima* (L.) Baker. Using thidiazuron. *Biotechnologie and Biotechnological equipment*. PP:925-928.
2. **AGHILI, M. (2009).** Makhzan-al-Advia. Tehran University of Medical Sciences. PP: 146.
3. **ALANIS AJ. (2005).** Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? *Arch Med Res*. 36(6):697-705
4. **ALQOSH Z., JARJES A., MAHMOOD A. , IBRAHIM H. (2016).** Identification of some Chemical Constituents and Antibacterial Activity of *Urginea maritima* (L.) Extracts from Kurdistan Region, Bozan area. *ZANCO Journal of Pure and Applied Sciences* : 28 (6). PP 211-232..
5. **AUGUSTO F., VALENTE A.L.P., 2000 Tada E.D.S., Rivellino S.R.,** Journal of Chromatography A, 873, 17-127.
6. **BOUAYED J., RAMMAL H., YOUNOS C., DICKO A., SOULIMANI R. (2008).** Caractérisation et bioévaluation des polyphénols : nouveaux domaines d'application en santé et nutrition. *Journal of biotechnology, Springer*. Volume 6, Issue 2. PP 71-74.
7. **BELHADDADI O, CHAREF1 N, AMAMRA1 S,ZERARGUI1 F, BAGHIANI1 A, SEDDIK K , LEKHMICI A (2017).** Chromatographic fractionation, antioxidant and antibacterial activities of *Urginea maritime* methanolic extract. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*. Vol.30, No.1. PP :127-134
8. **BELLAKHDAR J.(1997)** La pharmacopée marocaine traditionnelle : médecine arabe ancienne et savoir populaire. Ed Paris, Ibis Press. P764.
9. **BENKHNIGUE O, ZIDANE L, FADLI M, EL YACOUBI H, ROCHDI A, DOUIRA A. (2010-2011).** Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la rgion de Mechraa Bel Ksiri (Région du Gharb du Maroc). *Acta Bot. Barc*. 53. PP:191-16
10. **BENOUDA A; TAGAJDID M.R. (2008).** Antibiogramme: choix, interpretation et limites. *Revue : Les technologies de laboratoire* Vol.3, N°10
11. **BRUNETON J (2009).** Pharmacognosie Phytochimie Plantes médicinales., 4^{ème} édition Tec & Doc , Lavoisier.P 262.
12. Biokar-diagnostics.fr.
13. **DAOUDI L. BAMMOU A, HALOUI Z, IBIJBIJEN J, NASSIRI L (2017).** Activité Antifongique Des Extraits Aqueux De *Calendula Officinalis* L, *Urginea Maritima* (L.) Baker Et *Chenopodium Ambrosioides*. *European Scientific Journal* Vol.13, N°24. PP: 1857 – 7881.
14. **DEEPAK, A., THIPPESWAMY, G., SHIVAKAMESHWARI, M., & SALIMATH, B. P. (2003).** Isolation and characterization of a 29-kDa glycoprotein with antifungal activity from

- bulbs of *Urginea indica*. *Biochemical and Biophysical research communications*, 311(3), PP:735-742.
15. **DELARRAS C. (2007)**. Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Ed. Lavoisier, Paris. P : 476.
 16. **DIALLO D., SANOGO R., YASAMBOU H., TRAORÉ A., COULIBALY K., MAIZA, A.(2004)**. Etude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana* Lam. (Rhamnaceae) utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali. *C. R. Chimie*: 7. PP 1073-1080.
 17. **DIZAYE K, HAMAD B (2010)**. Cardiovascular studies of white squill (*Urginea maritima*) *Revue extract*. PP:1-11
 18. **EL HAFIAN M, BENLAMDINI N, EL YACOUBI H , ZIDANE L, ROCHDI A. (2014)**. Etude floristique et ethnobotanique des plantes médicinales utilisées au niveau de la préfecture d'Agadir-Ida-Outanane (Maroc). *Journal of Applied Biosciences* 81 PP:7198-7213.
 19. **EMAN ZAKARIA GOMAA (2012)**. Chitinase Production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: Their Potential in Antifungal Biocontrol. *The Journal of Microbiology* Vol. 50, No. 1. PP: 103–111.
 20. **HELLER R (1969)**. Biologie végétale II Nutrition et Métabolisme. MASSON ET C^{ie} , Editeurs. PAGE 166.
 21. **NEJATBAKHTA F, KAREGAR-BORZIA H, GHOLAMREZA A, ALIREZA E, HOSSEINID M, BOZORGIE M, GHARABAGHIF M. (2017)**. Squill Oxymel, a traditional formulation from *Drimys Maritima* (L.) Stearn, as an add-on treatment in patients with moderate to severe persistent asthma: A pilot, triple-blind, randomized clinical trial. *Journal of Ethnopharmacology* 196, Pp. 186–192.
 22. **FERNIQUE K. KONAN, NATHALIE K. GUESSENND, K.R. OUSSOU, CALIXTE BAHIA, COULIBALY, A.J. DJAMAN ET M. DOSSO (2014)**. Effet antibactérien de l'extrait aqueux de l'écorce de *Terminalia glaucescens* Planch ex Benth (Combretaceae) sur la croissance in vitro des entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi (EBLSE). *International Journal of Biology and Chemical Science*. 8(3). PP: 1192-1201.
 23. **GALIP K, CÝVELEK H (2009)** Effects of Two Plant Extracts on the Damage of *Meloidogyne incognita* in Tomato Plants. *Revue Ekoloji* 18, 72, 16-22 .
 24. **GARNIER F, DENIS F. (2007)**. Bactériologie médical : Techniques usuelles : Cocci à Gram positif. Masson. Chapitre 29 .251, 254 .
 25. **GROVER, RK. ; MOORE, J.D (1962)**. Toximetric studies of fungicides against brown rot organism: *S. fructicola* et *S. laxa*. *Revue Phytopathoogy* : 52. PP 876-880.

26. **HENNEBELLE T., SAHPAZ S., BAILLEUL F. (2004).** Polyphénols végétaux, source, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Journal Springer, Volume 2, Numéro1.* PP 3-6.
27. **HMAMOUCHE M. (1999).** Les plantes médicinales et aromatiques marocaine. Ed FEDALA Rabat. P 389.
28. **IBN SINA, A. (2005).** Al-Qanun fi al-tibb 3. Alamy *Le-Al-Matboat institute revue.* PP:499–509.
29. **KAREGAR-BORZI, H., SALEHI, M., RAHIMI, R. (2015).** Laūq A sustained-release dosage form for respiratory disorders in traditional Persian medicine. J. Evid. Based Complement. *Journal Alternative Medecine.*
30. **LADOH J. 2014.** Activité antioxydante des extraits méthanoliques de Phragmanthera capitata(Loranthaceae) récoltée sur Citrus sinensis *Journal of Applied Biosciences* :84 PP 7636– 7643
31. **MAAZOUN A, TAKOUA B, SOUMAYA H, FETEN B, JOUDA M, MARZOUKIA M (2017).** Screening for insecticidal potential and acetylcholinesterase activity inhibition of *Urginea maritima* bulbs extract for the control of *Sitophilus oryzae* (L.). *Journal of Asia-Pacific Entomology* :20 PP 752–760.
32. **MACHEIX J, FLEURIET A, JAY-ALLEMAND C (2005).** Les composés phénoliques des végétaux Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique 4^{ème} édition Tec & Doc , Lavoisier page 1.
33. **PAREKH J, SUMITRA C (2007).** Antibacterial and phytochemical studies on twelve species of Indian medicinal plants. *African Journal of Biomedical Research*, Vol. 10: PP175 – 181
34. **MAHER O; SHARAB A (2018).** Antimicrobial and anticancer activities of extracts from *Urginea maritima* fruits. *African journal of traditional, complementary and alternative medicines* : 15(1): PP 74-84.
35. **MAIRE R , GUINOCHET M, QUÉZEL P. (1958).** Flore de l'Afrique du Nord. Vol5 ÉDITIONS PAUL LECHEVALIEHR. P : 304.
36. **MERT M, BURUN B (2014)** Effects of the High Doses of *Urginea maritima* (L.) Baker Extract on Chromosomes1). *Journal Caryologia-Frienze* 63(4):367-375.
37. Microbiologie-médicale.fr.
38. **MOHAMMEDI Z. (2005).** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles

- essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. *Thèse de Magistère*. Université Abou Bakr Belkaïd, Tlemcen. PP 250.
- 39. MOLYNEUX, P (2004).** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarín J. Sci. Technol.* 26, PP 211-2.
- 40. PARIS P. R. MOYSE H. (1967).** Précis de matière médicale, éd Masson, Paris, P512.
- 41. QUEZEL P., SANTA S. (1962).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. EDITIONS DU CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE. P : 1090.
- 42. QUEZEL P., SANTA S. (1963).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales . TOME 1. EDITIONS DU CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE. P :1170.
- 43. HELLER R (1969).** Biologie végétale II Nutrition et Métabolisme. MASSON ET C^{ie} , Editeurs. PAGE 166.
- 44. SENNOUCI B., ABD EL OUHID J (2010).** Méthodes et techniques en bactériologie. Ed.OPU Alger. PP 21-28-66.
- 45. SHARMA HJ , DEVI NS (2017).** Phytochemical Analysis of Drimia Species. *International Journal of Applied Science* . Vol 4 N°2:12.
- 46. SINGLETON L., ROSSI J-A(1965).** Colorometry of total phenolics with phospholybdi-phosphotungstic acid reagents. *American of enlogy and Viticulture*:16 PP 144-158.
- 47. SORO S., ABO K., KONE D., COFFI K., KOUADIO J. Y. et S. AKE (2011).** Comparaison de l'efficacité antifongique de l'huile essentielle d'Ocimum gratissimum L. et du fongicide de synthèse mancozebe contre le mycopathogène tellurique, *Fusarium oxysporum* f. sp. *Radicis-lycopersici* en culture de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) sous abrien dote d'ivoire. *Agronomie Africaine* 23 (1). PP: 43 – 52.
- 48. STOLL A. (1954).** Sur les substances cardiotoniques de la scille maritime (*Scilla maritima* L). *Experientia*. PP :282-283.
- 49. STEDJE B (1987).** A revision of the genus *Drimia* (Hyacinthaceae) in East Africa. *Nordic journal of Botany* / VOL 7, issue 6
- 50. ULRICH L, MANFRED K, GABRIELA B.** Botanique. 2^{ème} édition Tec & Doc , Lavoisier page 210.
- 51. VERBISCAR, ANTHONY J.; BANAGAN, THOMAS F.; GENTRY, HOWARD SCOTT (1986).** RECENT RESEARCH ON RED SQUILL AS A RODENTICIDE. Proceedings of the Twelfth Vertebrate Pest Conference. PP 26.

52. **POUSSET J.**, PLANTES MEDICINALES AFRICAINES. Edition Ellipses, 1989. PP 160.
53. **MAAZOUN A, TAKOUA B, SOUMAYA H, FETEN B, JOUDA M, MARZOUKIA M (2017).** Screening for insecticidal potential and acetylcholinesterase activity inhibition of *Urginea maritima* bulbs extract for the control of *Sitophilus oryzae* (L.). *Journal of Asia-Pacific Entomology* :20 PP 752–760.

ANNEXES

Annexe N°01

Coloration de Gram

La coloration de Gram est basée sur 4 principales étapes.

Les bactéries Gram- apparaissent roses et les Gram+ violettes à l'observation microscopique.

Etape 1 : réalisation d'un frottis qui est séché et fixé.

a) A partir d'un bouillon : déposer au centre de la lame 1 goutte de bouillon ; étaler

b) A partir d'un isolement sur gélose : déposer une petite goutte d'eau (flacon du portoir à colorants) au centre de la lame. Faire une suspension homogène avec une seule colonie prélevée à l'anse. Etaler sur environ $\frac{1}{4}$ de la lame.

- Laisser sécher en chauffant légèrement la lame au-dessus de la flamme. Ne pas brûler les bactéries sinon l'observation sera délicate voire impossible. La lame doit être totalement sèche.

- Fixer le frottis en versant 1 ou 2 gouttes (pas plus) d'alcool 100° sur la lame et enflammer à l'aide d'une allumette.

- Laisser refroidir.

Etape 2 : coloration au violet de Gentiane suivie d'un mordantage par une solution iodo-iodurée de Lugol.

- Recouvrir toute la lame de Violet de Gentiane. Laisser 1 minute.

- Chasser le violet avec le Lugol. Laisser 1 minute.

- Rincer à l'eau. Egoutter la lame.

Etape 3 : décoloration à l'alcool

- Recouvrir la lame d'alcool 100°. Attendre 15 secondes.

- Rincer immédiatement à l'eau. Laisser un peu d'eau sur la lame.

Etape 4 : recoloration à la fuchsine. - Mettre 2 gouttes de Fuchsine. Laisser 1 minute.

- Laver abondamment à l'eau.

- Sécher délicatement la lame dans un papier jetable. Nettoyer au besoin le dessous de la lame avec un papier jetable. La lame doit être totalement sèche.

- Observer à l'immersion en pleine lumière en mettant une goutte d'huile à immersion sur la lame totalement sèche. Observer à l'objectif x 100 (objectif à immersion). Ouvrir le diaphragme. (Monter le condensateur si le microscope le permet). L'objectif doit toucher la goutte d'huile.

Annexe N°02

Résultats des tests de la ré-identification bactérienne

- **Résultats de l'ensemencement**

La figure N°01 représente les résultats obtenus de l'ensemencement des bactéries étudiées.

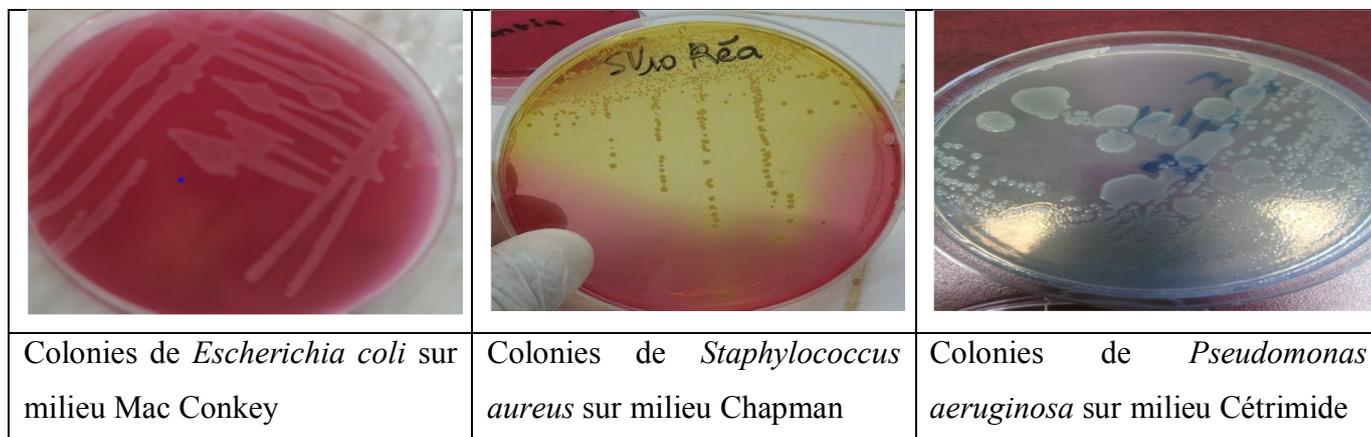


Figure N°01 : Caractères macroscopiques des souches étudiées sur leurs géloses sélectives.

- **Résultats de coloration de Gram**

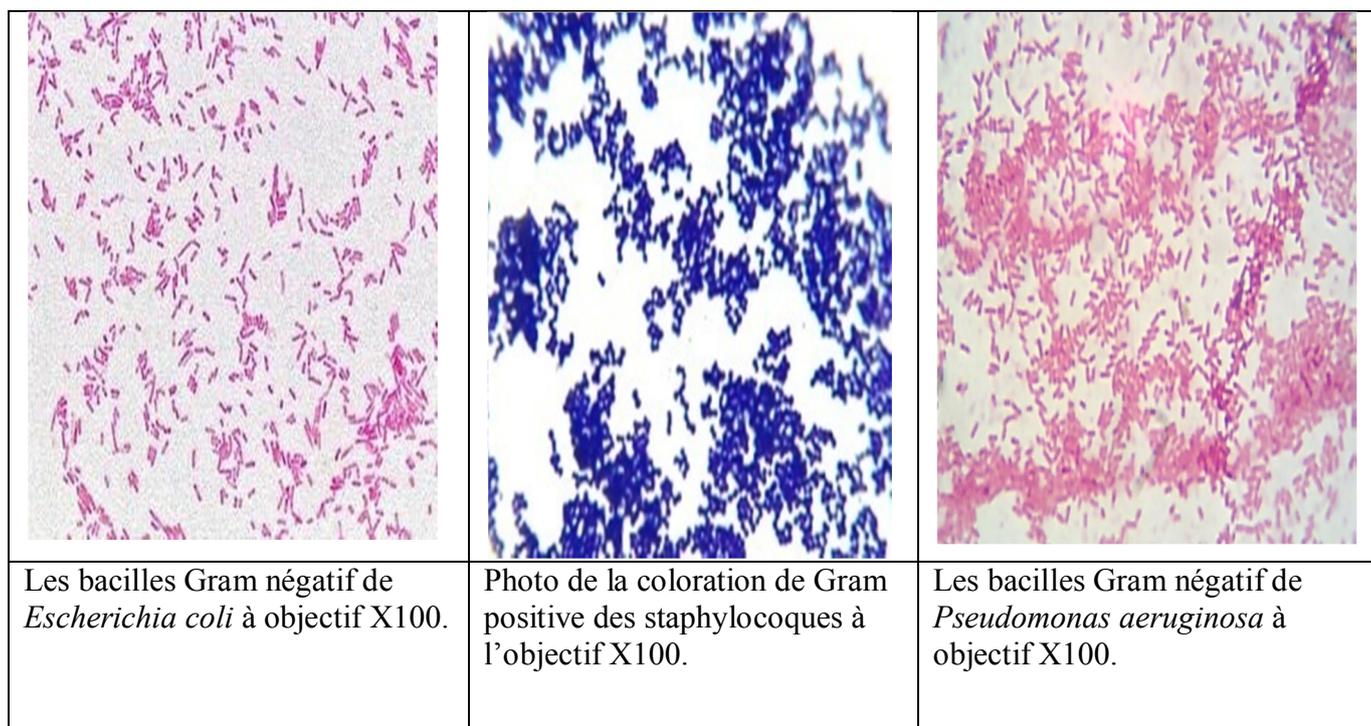


Figure N°02 : Résultats de la coloration de Gram des 3 souches bactériennes étudiées.

- **Résultats des tests d'identification biochimiques classiques (tests communs)**

Les résultats des tests d'identification biochimique classique, sont mentionnés dans le tableau ci-dessous.

Tableau N°01: Résultats des tests d'identification biochimique classique (tests communs)

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Oxydase	-	-	+
Catalase	+	+	+
ONPG	+	+	+
Mannitol mobilité	Mannitol+ Mobilité+	Mannitol+ Mobilité-	Mannitol- Mobilité+
ADH	+	+	-
LDC	+	+	-
ODC	-	+	-
Schubert cloche	+	+	+
Urée indole	Indole+	Indole-	Indole+
TSI	-	-	-
Citrate Simmons	+	+	+

- **Résultats des tests d'identification biochimique classique (tests spécifiques pour chaque bactérie)**

Tableau N°02: *Escherichia coli*

Test	Résultat
Eosine Méthylène-Blue (EMB)	Colonies bombées avec éclat métallique
Clarck et Lubs	VP - RM+

Tableau N°03: *Staphylococcus aureus*

Test	Résultat
BD Mannitol Salt Agar	+ colonies de taille moyenne et de couleur jaune, milieu de couleur jaune.

Tableau N°04: *Pseudomonas aeruginosa*

Test	Résultat
King A	-
King B	-
Clarck et Lubs	VP+ RM-

- **Résultats de l'antibiogramme**

Après incubation, les disques s'entourent de zones d'inhibition circulaire correspondant à une absence de culture. Lorsque la technique est parfaitement standardisée, les diamètres des zones d'inhibition dépendent uniquement de la sensibilité du germe (Figure N°03).

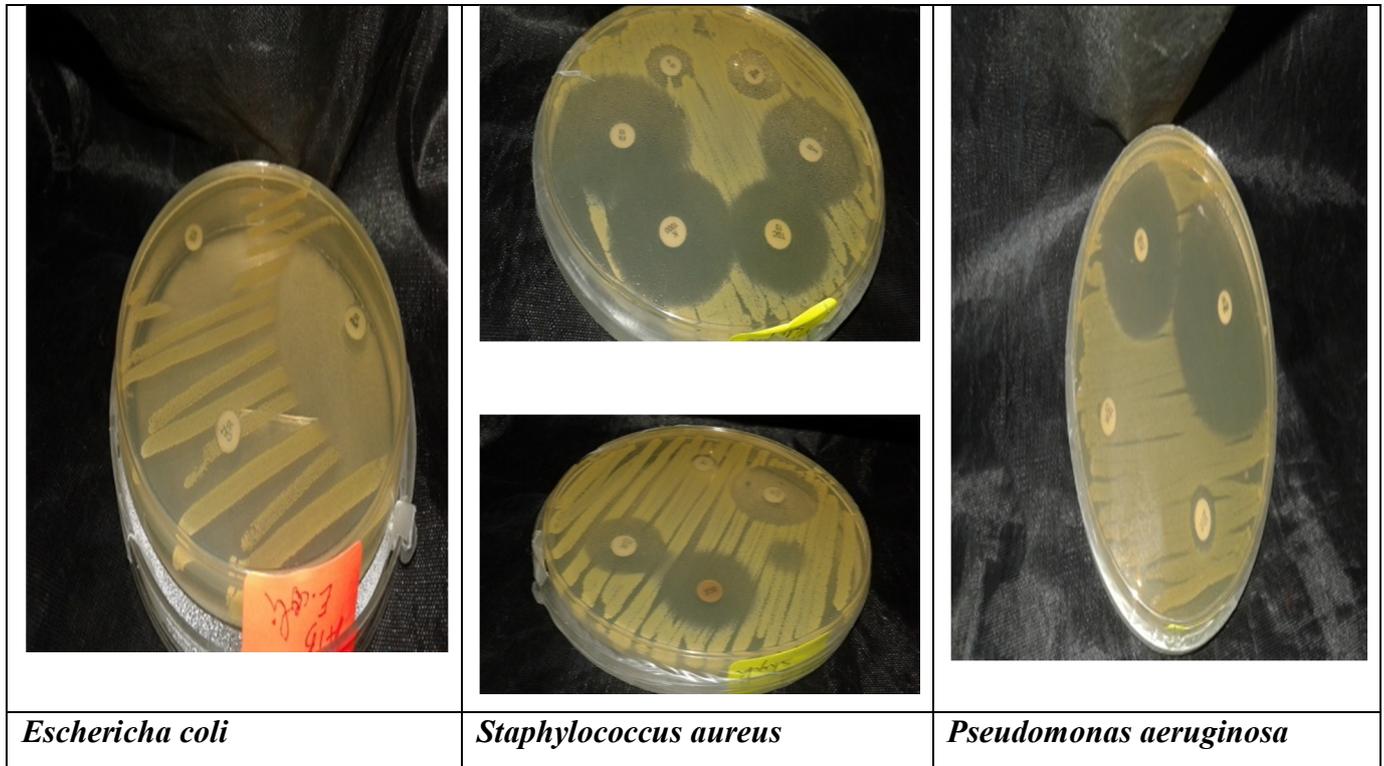


Figure N°03 : Test d'antibiogramme pour les 3 souches.

Tableau N°05 : Antibiogramme d'*E. coli*

Antibiotique	Diamètre de zone d'inhibition (cm)
CN500 (Céphalexine 500ug)	2.70
CAZ30 (Ceftazidime 30ug)	0
IPM10 (Imipénème 10ug)	3.82

Tableau N°06 : Antibiogramme de *S. aureus*

Antibiotique	Diamètre de zone d'inhibition (cm)
GEN50 (Gentamicine 50ug)	2.25
TE30 (Tétracycline 30ug)	2.25
CX30 (Céfuroxime 30ug)	2.02
OX1 (Oxacilline 1ug)	0
K1000 (Kanamycine 1000ug)	3.15

FA10 (Acide fusidique 10ug)	3.60
TGC15 (Tigecycline 15ug)	2.60
E15 (Erythromycine 15ug)	2.70
TEC30 (Teicoplanine)	1.60
P10 (Pénicilline G 10ug)	1.10

Tableau N°07 : Antibiogramme de *P. aeruginosa*

Antibiotique	Diamètre de zone d'inhibition (cm)
CN500 (Céphalexine 500ug)	2.30
TIC75 (Ticarcilline75ug)	0.70
CAZ30 (Ceftazidime 30ug)	0
IPM10 (Imipénème 10ug)	2.70

Annexe N°03

Lecture des résultats des galeries API

Tableau N°01 : Lecture API Staph

0	Rouge -
GLU	Jaune +
FRU	Jaune +
MNE	Jaune +
MAL	Jaune +
LAC	Jaune +
TRE	Jaune +
MAN	Jaune +
XLT	Jaune +
MEL	Jaune +
NIT	Rose pale -
PAL	Violet +
VP	Violet rose+
RAF	Jaune +
XYL	Jaune +
SAC	Jaune +
MDG	Rouge -
NAG	Jaune +
ADH	Orange rouge +
URE	Rouge violet +

Tableau N°02 : Lecture API 20 E

ONPG	Jaune +
ADH	Rouge orangé +
LDC	Rouge orangé +
ODC	Rouge orangé +
CIT	Bleu-vert +
H ₂ S	Dépôt noir +
URE	Rouge orangé +
TDA	Marron rougeâtre +
IND	Rose +
VP	Incolore-rose pale -
GEL	Diffusion du pigment noir +
GLU	Jaune gris +
MAN	Jaune +
INO	Jaune +
SOR	Jaune +
RHA	Jaune +
SAC	Bleu-vert -
MEL	Jaune +
AMY	Bleu-vert -
ARA	Bleu-vert -

Tableau N°03 : Lecture API NE

NO ₃	Incolore +
TRP	Jaune -
GLU	Bleu à vert -
ADH	Rouge +
URE	Rouge+
ESC	Jaune -
GEL	Diffusion du pigment noir +
PNPG	Jaune +
GLU	Transparence -
ARA	Trouble +
MNE	Transparence -
MAN	Trouble +
NAG	Transparence -
MAL	Transparence -
GNT	Trouble +
CAP	Transparence -
ADI	Transparence
MLT	Transparence
CIT	Transparence
PAC	Transparence

Annexe N°04

L'effet antibactérien de l'extrait méthanolique d'*Urginea maritima* sur les bactéries testées

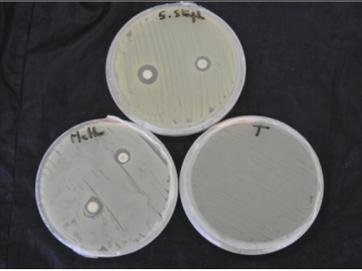
		
100 mg/ml	50 mg/ml	40 mg/ml
		
10 mg/ml	20 mg/ml	30 mg/ml
		
	5 mg/ml	

Figure N°01 : Effet de l'extrait méthanolique d'*Urginea maritima* sur le développement de *Staphylococcus aureus* en milieu solide par la technique de diffusion.

		
100 mg/ml	50 mg/ml	40 mg/ml
		
10 mg/ml	20 mg/ml	30 mg/ml
		
	5 mg/ml	

Figure N°02 : Effet de l'extrait méthanolique d'*Urginea maritima* sur le développement de *Pseudomonas aeruginosa* en milieu solide par la technique de diffusion.

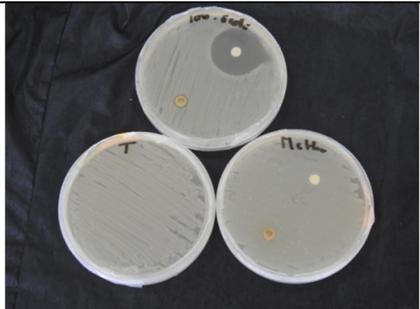
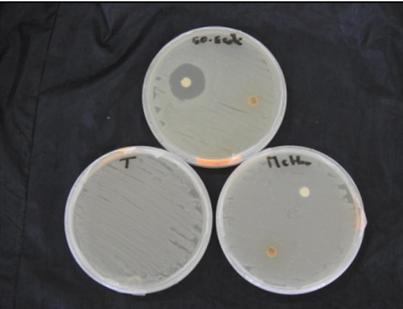
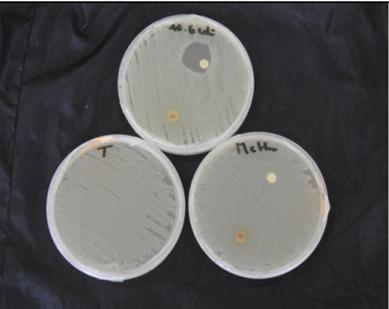
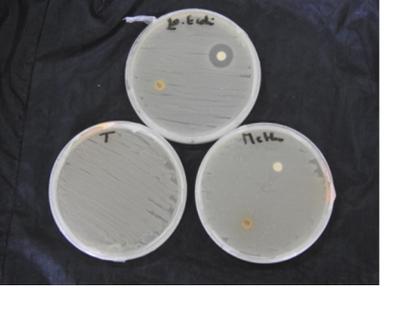
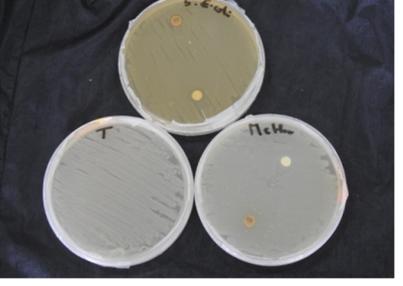
		
100 mg/ml	50 mg/ml	40 mg/ml
		
10 mg/ml	20 mg/ml	30 mg/ml
		
	5 mg/ml	

Figure N°03 : Effet de l'extrait méthanolique d'*Urginea maritima* sur le développement de *Escherichia coli* en milieu solide par la technique de diffusion.

Annexe N°05

Composition des principaux milieux de culture utilisés

- **Gélose Mueller-Hinton**

Infusion de viande de boeuf.....	300ml
Peptone de caséine.....	17.5g
Amidon de maïs.....	1.5g
Agar.....	10.0g
pH= 7.4	

Préparation : 38g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave à 120°C, 15min.

- **Milieu de Chapman**

La formule théorique de ce milieu de culture en g/L d'eau purifiée est :

Extrait de viande (bovin ou porcin).....	1g
Peptone de caséine et de viande (bovin et porcin).....	10g
Chlorure de sodium.....	75g
Mannitol.....	10g
Agar.....	15g
Rouge de phénol.....	0,025g
pH=7,6	

Préparation : 111g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave : 15 minutes à 120°C.

- **Gélose de cétrimide**

Les ingrédients sont en grammes par litre d'eau distillée

Peptones.....	20g
Sulfate de potassium.....	10g
Chlorure de magnésium.....	1.4g
Cétrimide.....	0.3g
Agar.....	13.6g
Glycérol.....	10ml
pH=7,1	

Préparation : 24g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave : 15 minutes à 120°C.

- **Gélose de Mac Conkey**

Les ingrédients sont en grammes par litre d'eau distillée

Peptones pancratique de gélatine.....	17g
Tryptone	1g
Peptones pepsique de viande.....	1.5g
Lactose.....	10g
Sels biliaires.....	10.5ml
Chlorure de sodium.....	5g
Rouge neutre.....	30g
Cristal violet.....	1g
Agar agar bactériologique.....	13.5g

pH=7,1

Annexe N°06
Réactifs et solutions

1- Sérum physiologique

Chlorure de Sodium.....	9g
Eau distillée	1000 mL

2- Réactifs de la coloration de Gram

• **Violet de gentiane**

Phénol.....	2.0 g
Violet de gentiane.....	1.0 g
Éthanol à 90°.....	10 ml
Eau distillée.....	100 ml

• **Lugol**

Iodure de potassium.....	2.0 g
Iode métalloïde.....	1.0 g
Eau distillée	300 ml

• **Fuschine de ziehl**

Fuchine basique.....	1.0g
Phénol.....	5.0 g
Éthanol à 90°.....	10 ml
Eau distillée	100 ml

3- Réactif Folin Ciocalteu 1/10 : 1ml de réactif pur +9 ml de l'eau distillée.

4- DPPH 0.004% : 0.004g de DPPH dans 100 ml de méthanol .agitation dans le bain secoueur pendant 30 min.

5- Réactif de Molisch (solution alcoolique de α -naphtol 1%) : 1g de α -naphtol + 100 ml d'éthanol.

Résumé

La toxicité du médicament, l'intolérance, les difficultés de suivi, le cout élevé des traitements pour les infections dues aux microorganismes pathogènes ou multi résistants incite à la recherche d'un autre alternatif bio disponible. La présente étude a été faite dans le but d'évaluer l'effet biologique de l'extrait méthanolique des bulbes d'*Urginea maritima* sur des bactéries multi résistantes ; *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*, des champignons potentiellement pathogènes ; *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger*. L'extraction des composés phénoliques a été faite par macération à froid (méthanol 80%). Le dosage des poly phénols et la capacité de piégeage des radicaux libres (DPPH) par spectrophotomètre a donné respectivement les résultats suivants : $279,504762 \pm 99,5544281$ mg EAG/100g d'extrait et $271,018 \pm 26,3088486$ μ gEAA_s/100g d'extrait des bulbes. Une caractérisation phytochimique a été faite sur l'extrait par HPLC et par des méthodes colorimétriques (screening phytochimique). Les tests de sensibilité des souches bactériennes ont été faits par la technique de diffusion sur un milieu solide, en ce qui concerne les champignons par la technique d'incorporation ; les résultats pourraient justifier l'utilisation traditionnelle de *Urginea maritima* pour traiter de nombreuses affections.

Mots clés : *Urginea maritima*, poly phénols, DPPH, HPLC, Screening phytochimique, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Fusarium oxysporum*, et *Aspergillus niger*.

المخلص

إن الأدوية و ما لها من آثار جانبية من تسمم, حساسية, و صعوبة متابعة العلاج ضد الميكروبات المرضية وبالأخص السلالات المقاومة تشجع على البحث عن بديل ذو توافر حيوي.

وقد كانت هذه الدراسة بهدف تقييم التأثيرات البيولوجية للمستخلص الميثانولي من بصيلة العنصل البحري *urginea maritima* وذلك على بكتيريا أظهرت مقاومة لعدة مضادات حيوية, اختص البحث بكل من:

Fusarium, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *oxysporum*, *Aspergillus niger*

عملية استخلاص المركبات الفينولية تمت بواسطة النقع على البارد باستعمال الميثانول 80% معايرة المركبات متعددة الفينول وكذا مدى سعتها للارتباط بالجذور الحرة (خاصية مضادة الأكسدة) تمت عن طريق قياس الضوء الطيفي النتائج كانت كالتالي : 279.50 ± 99.55

كما شملت الدراسة تحليل المستخلص بتقنية hplc أو كروماتوغرافيا السائلة عالية الدقة وذلك بهدف تحديد الخصائص الفيتوكيميائية إضافة إلى تقنيات المقياس اللوني

اختبار حساسية البكتيريا للمضاد الحيوي اجري بطريقة الانتشار في وسط صلب. بالنسبة للفطريات تم الاختبار تقنية الإدماج

نتائج هذه الدراسة ترجح إمكانية استخدام نبتة العنصل البحري كعلاج لبعض الإصابات

الكلمات المفتاحية : *Urginea maritima*, polyphenols, DPPH, HPLC, Phytochemical Screening, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Fusarium oxysporum*, and *Aspergillus niger*.