



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche

Scientifique

Université Dr. Moulay Tahar de Saïda

Faculté des Sciences

Département De Biologie

Laboratoire de Biotoxicologie, Pharmacognosie Et Valorisation biologique des Plantes



**MEMOIRE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME
DE MASTER EN BIOLOGIE**

Option : **Microbiologie appliquée**

Présenté par :

M^{elle}. HEBBAR Fatna

M^{elle}.MEGHERBI Chiraz

Sur le thème intitulé :

**Contribution à l'étude des activités biologiques et le mécanisme
d'action de quelques extraits d'*Artemisia campestris***

Soutenu le : 17 - 07 -2019.

Devant la commission de jury, composée de :

M. ADLI Djallal Eddine Houari	Maître de conférences -A-	U T. M. de Saïda	Président
M. GHELLAI Lotfi	Maître de conférences -A-	U T. M. de Saïda	Examineur
M. HALLA Noureddine	Maître Assistant classe -A-	U T. M. de Saïda	Encadreur

Année universitaire : 2018/2019

« *Je suis de ceux qui pensent que la science est d'une grande beauté...*

Un scientifique dans son laboratoire est non seulement un technicien : il est aussi un enfant placé devant des phénomènes naturels qui l'impressionnent comme des contes de fées »

- *Marie Curie Physicienne, Scientifique (1867 - 1934)*

REMERCIEMENTS

En premier, nous tenons à remercier Allah, le très puissant, qui nous a donné la santé et le courage pour aller au bout de ce travail.

Nous tenons particulièrement à remercier **M. HALLA Nouredine** qui, par sa grande compétence scientifique, ses précieux conseils et son implication assidue nous a aidé et soutenu tout au long de ce travail de recherche. Nous le remercions très sincèrement pour son immense disponibilité, son dynamisme et son écoute constante, attentive et constructive.

Nous exprimerons toute notre gratitude à **M. ADLI Djalal Eddine Houari**, Maître de conférences classe A, à l'Université de Saida, pour ses conseils et ses recommandations et nous le remercions pour nous avoir fait l'honneur de présider le jury.

Nous remercions vivement **M. GHELLAI Lotfi**, Maître de conférences classe A, à l'Université de Saida, d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Nous remercions étroitement notre cher **M. BENRGUIEG Mokhtar**, Maître de conférences classe A, à l'Université de Saida, de nous avoir toujours soutenue et encouragée durant toutes ces années.

Nos remerciements s'adressent également à tous les membres du laboratoire de Biotoxicologie, Pharmacognosie et Valorisation Biologiques des Plantes (LBPVBP) et le laboratoire pédagogique au département de biologie à la faculté des sciences de l'université Dr. Moulay Tahar de Saida.

Nous tenons à remercier les membres du laboratoire pédagogique au département de biologie à la faculté des sciences de l'université de l'université de Mostaganem.

Nous adressons nos remerciements à **Mlle. DELLAOUI Hafsa**, **Mlle. Belhachemi Majda**, **Mlle. Hamidat Nourhane** qui nous a beaucoup aidé, ainsi que tout qui a contribué de loin ou de près à la réalisation de ce travail.

Dédicace

À la mémoire de ma grand-mère que Dieu repose son âme en paix

À ma mère, en témoignage de ma profonde affection...

Qu'elle sache que ce travail est en partie le fruit de son soutien, sa fierté à mon égard aujourd'hui est pour moi la meilleure des récompenses

À mes tantes et mon oncle pour leurs soutiens au long de mes études, je ne les remercierai jamais assez, pour tout ce qu'ils m'ont fait.

À ma sœur Yasmine qui a été toujours là pour moi.

À mes chères amies Asmaï, Fatna qui m'ont encouragé et soutenu pendant mes études.

Megherbi Chiraz

Dedicace

Je dédie ce travail à ma grand-mère qui aurait été comblée de bonheur, s'elle était de ce monde que Dieu ait son âme et l'héberge dans son vaste paradis.

À ma source de bonheur, mes parents, mon père qui m'a toujours encouragé, et à ma mère que Dieu le tout-puissant la protège et lui donne la force pour qu'elle continue à couronner notre vie.

À mes chères sœurs Lamia et Aicha et mes frères Oussama et Mouhamed.

À toute ma famille

À mes chères amies, Asmaà, Chiraz, Maja, Nourhane, Souad et Soumeya.

Kezbar Fatna

Résumé

L'objectif de la présente étude est la contribution à l'étude des activités biologiques et les effets des extraits d'*Artemisia campestris*, qui est une plante largement utilisée par la population algérienne et en médecine traditionnelle. Ce travail s'intéresse à déterminer la composition phytochimique des extraits d'*Artemisia campestris* et d'étudier leurs activités biologiques. Les activités biologiques consistent une évaluation de l'activité antioxydante (capacité antioxydante totale et le de piégeage du radical DPPH), une évaluation de l'activité antimicrobienne par quatre méthodes, une étude de l'effet antimicrobien (viabilité cellulaire, tolérance au sel et l'activité de lipases), et finalement, une étude de la cytotoxicité vis-à-vis les érythrocytes.

Les résultats des tests phytochimiques ont montré que la plante *Artemisia campestris* récoltée de la région d'Ain el Hdjar de la wilaya de Saida, avait une composition phytochimique diversifiée y compris les alcaloïdes, les tannins catéchiques, les anthocyanes, les coumarines, stérols et les triterpènes, et les saponines... L'évaluation de la capacité antioxydante totale a révélé que l'extrait aqueux avait une forte activité estimée par 26,24mg EAG/g MS, le test de piégeage du radical DPPH a confirmé le pouvoir antioxydant de l'extrait aqueux d'*Artemisia campestris* avec un IC50 égale à 0,49 mg/ml. L'activité antifongique des extraits d'*Artemisia campestris* avait une efficacité sur la souche *Endosporium spp* avec un indice antifongique de 65% par l'extrait hexanique. Les zones d'inhibition obtenues par la méthode de diffusion des disques ont révélé que *Bacillus cereus* avait la plus sensible vis-à-vis l'extrait méthanolique par un diamètre de 18.5 mm. Les valeurs de concentration minimale inhibitrice (CMI) enregistrées par les extraits étudiés varient de 0,39 mg/ml à 12,5 mg/ml, et les valeurs de concentration minimale bactéricide sont variées de 0.78 mg/ml à 25 mg/ml. L'extrait méthanolique a montré un effet inhibiteur de la viabilité de *Staphylococcus aureus* avec une réduction du nombre des colonies, ainsi que la perte de sa tolérance au sel et son activité de lipases après le traitement de la souche par des différentes concentrations de l'extrait méthanolique. La cytotoxicité d'*Artemisia campestris* vis-à-vis les globules rouges humains a été enregistré à la concentration 6,25 mg/ml. En conclusion, les résultats ont montré des divers effets et activités biologiques des extraits d'*Artemisia campestris* en fonction des concentrations utilisées.

Mots clés : *Artemisia campestris*, tests phytochimiques, activités biologiques, activité antioxydante, activité antimicrobienne, cytotoxicité.

Abstract

The objective of this study is the contribution to the study of biological activities and the effects of *Artemisia campestris*, which is a plant widely used by the Algerian population and in traditional medicine.

This work aims for detection of the phytochemical composition of *Artemisia campestris*'s extracts and studying their biological activities.

The biological activities consist to evaluate the antioxidant activity (total antioxidant capacity and the DPPH scavenger), In addition to, the evaluation of the antimicrobial activity by four methods, and the study of the antimicrobial effect (cell viability, salt tolerance and lipase activity), and finally, the study of cytotoxicity towards erythrocytes.

The results of phytochemical screening revealed that the plant *Artemisia campestris* obtained from Ain el Hdjar region of Saida city, had a diversified phytochemical composition including alkaloids, catechin tannins, anthocyanin's, coumarins, sterols and triterpenes, and saponins ... The evaluation of the total antioxidant capacity revealed that the aqueous extract had a high activity estimated by 26.24mg EAG / g MS, the DPPH radical scavenging test confirmed the antioxidant power of the aqueous extract of *Artemisia campestris* with an IC₅₀ equal to 0.49 mg / ml. The antifungal activity of extracts of *Artemisia campestris* was effective on the *Endosporium spp.* Strain with an anti-fungal index of 65% by the hexanic extract. The inhibition zones obtained by the disk diffusion method revealed that *Bacillus cereus* was the most sensitive to the methanolic extract by a diameter of 18.5 mm. The minimum inhibitory concentration (MIC) values recorded by the extracts studied ranged from 0.39 mg / ml to 12.5 mg / ml, and the minimum bactericidal concentration values ranged from 0.78 mg / ml to 25 mg / ml. The methanolic extract showed an inhibitory effect on the viability of *Staphylococcus aureus* with a reduction in the number of colonies, as well as the loss of its salt tolerance and lipase activity after the treatment of the strain by different concentrations of the methanolic extract. The cytotoxicity of *Artemisia campestris* to human red blood cells was recorded at a concentration of 6.25 mg / ml.

In conclusion, the results showed various effects and biological activities of extracts of *Artemisia campestris* depending on the concentrations used.

Key words: *Artemisia campestris*, phytochemical tests, biological activities, antioxidant activity, antimicrobial activity, cytotoxicity.

ملخص

يهدف هذا العمل لاكتشاف التركيبة الكيميائية النباتية لمستخلصات نبتة الشيح الحقلي *Artemisia campestris* ودراسة أنشطتها البيولوجية.

تتألف هذه الأنشطة البيولوجية من تقييم نشاط مضادات الاكسدة (اجمالي سعة المضادات وكسح DPPH). ثانيا، تقييم نشاط مضادات الميكروبات ودراسة تأثير مضادات الميكروبات وطريقة عملها باختبار قابلية الخلية للتعيش وتحمل الملح ونشاط الليباز وأخيرا دراسة السمية الخلوية تجاه الكريات الدموية الحمراء.

أظهرت نتائج الاختبارات الكيميائية النباتية ان *Artemisia campestris* الذي تم جمعه من منطقة عي الحجر لولاية سعيدة انها غنية و متنوعة بما في ذلك الكلويدات, عقص الكاتيشين, ستيروول و مكونات كيميائية أخرى...

كشفت سعة المضادات الاكسدة ان المستخلص المائي كان له نشاط يقدر بـ 26.24 ملجم/EAG في مادة المجففة. أكد اختبار الكسح الجذري DPPH قدرة مضادات الاكسدة في المستخلص المائي للنبتة المدروسة مع IC50 يقدر بـ 0.49 ملجم/مل.

كان نشاط المضاد للفطريات في مقتطفات النبتة المدروسة فعالا في سلالة *Endosporium spp* مع مؤشر مضاد الفطريات بنسبة 65% بواسطة مستخلص الهكساني. كشفت نتائج عملية نشر أقراص ان *Bacillus cereus* كانت أكثر حساسية لمستخلص الميثانول بقطر يصل الى 18.50 مم. يتراوح التركيز المثبط الأدنى MIC يقدر بـ 0.39 ملجم/ مل الى 12.5 ملجم/مل ويتراوح الحد الأدنى لتركيز الجراثيم من 0.78 ملجم/مل.

اظهر مستخلص الميثانول تأثيرا مثبتا على صلاحية المكورات العنقودية مع انخفاض عدد المستعمرات بالإضافة الى فقد تحملها للملح ونشاط الليباز بعد معالجة السلالة بتركيز مختلفة من مستخلص الهكساني.

في الختام، أظهرت النتائج ان للنبتة سمية خاصة في المستخلص المائي.

الكلمات المفتاحية: أنشطة بيولوجية، اختبارات كيميائية نباتية، نشاط مضاد اكسدة، السمية الخلوية، *Artemisia campestris*

Table des matières

Résumé.....	(i)
Liste des figures	(ii)
Liste des tableaux	(iii)
Liste d'abréviation	(iv)
Introduction générale.....	01
Partie I : synthèse bibliographique.....	04
Chapitre I : Généralités sur les plantes médicinales.....	05
1. Définition des plantes médicinales.....	06
2. Phytothérapie.....	06
3. Propriétés et vertus thérapeutiques des plantes médicinales.....	06
4. Métabolites secondaires.....	07
5. Modes de préparation des extraits des plantes médicinales.....	11
6. Huiles essentielles.....	12
6.1. Méthodes d'extraction des huiles essentielles.....	12
6.2. Méthodes d'identification des huiles essentielles.....	15
6.3. Propriétés d'utilisation des huiles essentielles.....	15
6.4. Conditions de conservation des huiles essentielles.....	16
Chapitre II: Présentation de la plante étudiée <i>Artemisia campestris</i>.....	17
1. Présentation de la famille des Astéracées.....	18
2. Présentation du genre <i>Artemisia</i>	18
3. Présentation de l'espèce <i>Artemisia campestris</i>	19
3.1.Nomenclature.....	19
3.2. Systématique de la plante.....	19
3.3. Description botanique d' <i>Artemisia campestris</i>	19
3.4. Composition chimique d' <i>Artemisia campestris</i>	20
3.5. Répartition géographique d' <i>Artemisia campestris</i>	22
3.6. Utilisations traditionnelles d' <i>Artemisia campestris</i>	22
Chapitre III : Activités biologiques d'<i>Artemisia campestris</i>.....	24
1. Généralité sur l'activité antimicrobienne.....	25
1.1. Activité antibactérienne d' <i>Artemisia campestris</i>	25
1.2. Activité antifongique d' <i>Artemisia campestris</i>	26
2. Activité antioxydante :.....	27
2.1. Généralité sur l'activité antioxydante.....	27
2.2. Stress oxydant.....	27
2.3. Radicaux libres.....	27
2.4. Sources des radicaux libres.....	28
2.5. Rôles pathologiques des radicaux libres.....	28
2.6. Les Antioxydants.....	28
2.7. Activité antioxydante d' <i>Artemisia campestris</i>	29
3. Activité insecticide d' <i>Artemisia campestris</i>	30
4. Activité antidiabétique d' <i>Artemisia campestris</i>	30
5. Activité antitumorale d' <i>Artemisia campestris</i>	30
6. Activité antihypertensive d' <i>Artemisia campestris</i>	30
Chapitre IV : Mécanisme d'action des antimicrobiens.....	32
1. Généralités sur les agents antimicrobiens.....	33
1.1. Classification des principaux agents antimicrobiens.....	33
1.2. Choix de l'agent antimicrobien.....	33
2. Mécanisme d'action des agents antimicrobiens.....	33

2.1. Mécanismes d'action des antimicrobiens d'origine végétale.....	34
2.2. Mode d'action des huiles essentielles.....	35
Partie II : Partie expérimentale.....	40
Matériel et méthodes.....	41
1. Matériel.....	42
1.1. Matériel végétal.....	42
1.2. Matériel biologique.....	43
1.2.1. Microorganismes.....	43
1.2.2. Globule rouge.....	43
2. Méthodes.....	44
2.1. Préparation des extraits.....	46
2.1.1. Délipidation.....	46
2.1.2. Extraction par macération.....	47
2.1.3. Extraction par infusion.....	49
2.1.4. Extraction des huiles essentielles.....	50
2.2. Tests phytochimique.....	51
2.2.1. Les alcaloïdes.....	51
2.2.2. Tanins.....	52
2.2.3. Flavonoïdes.....	52
2.2.4. Anthocyanes.....	52
2.2.5. Quinones.....	53
2.2.6. Saponines.....	53
2.2.7. Coumarines.....	53
2.2.8. Stérols et triterpènes.....	53
2.2.9. Composés réducteurs.....	54
2.3. Evaluation de l'activité antioxydante.....	54
2.3.1. Capacité antioxydante totale.....	54
2.3.2. Test d'activité anti-radicalaire (DPPH).....	54
2.4. Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	55
2.4.1. Activité antifongique.....	56
2.4.2. Technique de diffusion sur gélose (méthode des disques).....	56
2.4.3. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI).....	61
2.4.4. Détermination des concentrations minimales bactéricides (CMB) et fongicides (CMF).....	62
2.5. Etude de l'effet antibactérien de l'extrait d' <i>Artemisia campestris</i>	63
2.5.1. Conditions expérimentales générales.....	63
2.5.2. Tests de la viabilité cellulaire.....	64
2.5.3. Test de la tolérance au sel.....	65
2.5.4. Test de l'activité des lipases.....	65
2.6. Etude de la cytotoxicité vis-à-vis les érythrocytes.....	65
2.6.1. Préparation des solutions.....	65
2.6.2. Etude de la cytotoxicité de la plante <i>Artemisia campestris</i>	65
2.7. Etude statistique.....	67
PARTIE III : Résultats et discussion.....	68
1. Rendement des extraits.....	69
2. Aspect physique des extraits d' <i>Artemisia campestris</i>	70
3. Tests phytochimiques.....	72
4. Evaluation de l'activité antioxydante d' <i>Artemisia campestris</i>	75
4.1. Capacité antioxydant totale (CAT).....	67
4.2. Test d'activité anti-radicalaire (DPPH).....	77

5. Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	80
5.1. Activité antifongique de la plante <i>Artemisia campestris</i>	80
5.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne d' <i>Artemisia campestris</i>	82
5.2.1. Identification des bactéries.....	83
5.2.2. Méthode de Diffusion des disques sur gélose.....	84
5.2.3. Détermination des CMI et CMB et CMF de la plante <i>Artemisia campestris</i>	90
6. Effet de l'extrait d' <i>Artemisia campestris</i> vis-à-vis les souches bactériennes.....	93
6.1. Test de la viabilité cellulaire.....	94
6.2. Test de tolérance au sel.....	95
6.3. Test d'activité de lipases.....	96
7. Résultats de test de la cytotoxicité des extrait d' <i>Artemisia campestris</i> vis-à-vis les érythrocytes.....	98
Conclusion générale.....	102
Références bibliographiques.....	106
Annexes.....	118

Listes des figures

Figure 01 :	Partie aérienne de la plante d' <i>Artemisia campestris</i>	20
Figure 02 :	Carte géographique représente la zone de la récolte.....	42
Figure 03 :	Séchage de la plante <i>Artemisia campestris</i>	43
Figure 04 :	Schéma de la démarche expérimentale suivie dans cette étude.....	45
Figure 05 :	Procédure de la délipidation d' <i>Artemisia campestris</i>	47
Figure 06 :	Extraction d' <i>Artemisia campestris</i> par la macération.....	48
Figure 07 :	Filtration de l'extrait après 24h de macération.....	48
Figure 08 :	Evaporation sous vide de l'extrait méthanolique.....	48
Figure 09 :	Schéma illustrant l'extraction par macération	49
Figure 10 :	Extraction par la méthode d'infusion.....	49
Figure 11 :	Evaporation et concentration de l'extrait.....	49
Figure 12 :	Schéma illustrant l'extraction par infusion.....	50
Figure 13 :	Extraction des huiles essentielles d' <i>Artemisia campestris</i> par l'entraînement à la vapeur d'eau.....	51
Figure 14 :	Structure chimique du radical DPPH et sa forme réduite.....	55
Figure 15 :	Schéma illustrant les différentes méthodes pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne.....	56
Figure 16 :	Principe de la méthode de diffusion des disques.....	60
Figure 17 :	Etapes suivies de la méthode de diffusion des disques.....	60
Figure 18 :	Méthode d'utilisation de la microplaque à 96 puits.....	62
Figure 19 :	Préparation des boîtes de pétri pour le test de la CMB.....	63
Figure 20 :	Procédure de l'évaluation de la cytotoxicité de la plante vis-à-vis les érythrocytes.....	66
Figure 21:	Histogramme représentant les différents rendements des différents extraits d' <i>Artemisia campestris</i>	69
Figure 22 :	Résultats de screening phytochimique de l'extrait méthanolique.....	73
Figure 23:	résultats de screening phytochimique de l'extrait aqueux.....	74
Figure 24:	résultats de screening phytochimique d l'extrait Hexanique.....	74
figure 25 :	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour la détermination de la capacité antioxydante totale.....	75
Figure 26 :	Capacité antioxydante totale des extraits méthanolique et aqueux de la plante <i>Artemisia campestris</i>	77
Figure 27:	: Courbe des pourcentages d'inhibition de l'acide ascorbique à différentes concentrations pour la mesure de pouvoir de piégeage du radical DPPH.....	78
Figure 28 :	Profile de l'activité antiradicalaire (test DPPH) d'extrait méthanolique.....	78
Figure 29:	Profile de l'activité antiradicalaire (test DPPH) de l'extrait aqueux...	79
Figure 30 :	effet antifongique de l'extrait hexanique d' <i>Artemisia campestris</i>	81
Figure 31 :	effet antifongique d'extrait méthanolique d' <i>Artemisia campestris</i>	81
Figure 32 :	Effet de l'extrait méthanolique d' <i>Artemisia campestris</i> à la CMB sur la viabilité cellulaire chez <i>S. aureus</i> ATCC 25923 pendant 75 minutes.....	94
Figure 33 :	Histogramme représente les résultats de test de la viabilité cellulaire de tolérance au sel à déférentes concentrations d'extrait méthanolique d' <i>Artemisia campestris</i> vis-à-vis les cellules de staphylococcus aureus en milieu neutralisateur.....	95

Figure 34 :	histogramme représente les résultats de test de tolérance au sel à différentes concentrations d'extrait méthanolique <i>d'Artemisia campestris</i> vis-à-vis les cellules de <i>Staphylococcus aureus</i> en milieu GN-NaCl.....	96
Figure 35 :	Histogramme représente les résultats de test de l'activité de lipase à différentes concentrations d'extrait méthanolique <i>d'Artemisia campestris</i> vis-à-vis les cellules de <i>Staphylococcus aureus</i> en milieu AST.....	97
Figure 36:	Taux d'hémolyse induit par les huiles essentielles <i>d'Artemisia campestris</i>	98
Figure 37:	Taux d'hémolyse induit par l'extrait méthanolique <i>d'Artemisia campestris</i>	99
Figure 38 :	Taux d'hémolyse induit par l'extrait aqueux <i>d'Artemisia campestris</i> ...	100

Liste des tableaux

Tableau 01 :	Définition et propriétés des principaux composés qui représentent les métabolites secondaires.....	08
Tableau 02 :	Méthodes d'extraction des huiles essentielles.....	13
Tableau 03:	Composition chimique (%) l'huile essentielle issue de la partie aérienne d' <i>Artemisia campestris</i> de l'Algérie.....	21
Tableau 04 :	Composition chimique (%) l'huile essentielle issue de la partie aérienne d' <i>Artemisia campestris</i> de la Tunisie.....	21
Tableau 05 :	Parties utilisées, mode de préparation et utilisations traditionnelles d' <i>Artemisia campestris</i>	23
Tableau 06 :	Différents mode d'action de quelques molécules antibactériennes issue des huiles essentielles.....	37
Tableau 07 :	Géographie de la région.....	42
Tableau 08 :	Souches utilisées pour évaluer l'activité antimicrobienne.....	44
Tableau 09 :	Tableau informatif des conditions de la méthode de diffusion pour les bactéries et les levures.....	59
Tableau 10 :	Concentrations utilisées pour l'étude des mécanismes d'action.....	64
Tableau 11 :	Rendements massiques des extraits d' <i>Artemisia Campestris</i>	69
Tableau 12 :	Aspect physique de différents extraits d' <i>Artemisia campestris</i>	71
Tableau 13 :	Résultats du screening phytochimique d' <i>Artemisia campestris</i>	72
Tableau 14 :	Résultats de l'activité anti radicalaire des extraits d' <i>Artemisia campestris</i>	79
Tableau 15 :	Résultats d'identification macroscopique et microscopique des souches utilisées.....	83
Tableau 16 :	Valeurs des diamètres d'inhibition de l'extrait méthanolique.....	85
Tableau 17 :	Valeurs des diamètres d'inhibition de l'extrait hexanique.....	86
Tableau 18 :	Valeurs des diamètres d'inhibition de l'extrait aqueux.....	87
Tableau 19 :	Valeurs des diamètres d'inhibition des huiles essentielles.....	88
Tableau 20 :	résultats obtenus de la CMI et la CMB et le facteur CMB/CMI.....	91
Tableau 21 :	Concentration minimal inhibitrice (CMI), concentration minimal fongicide (CMF) et le rapport (CMF/CMI) vis-à-vis les <i>Candida albicans</i>	92
Tableau 22 :	Résultats des tests de l'activité antibactérienne d' <i>Artemisia campestris</i> vis-à-vis <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	94
Tableau 23 :	taux d'hémolyse des extraits de la plante <i>Artemisia campestris</i>	100

Liste d'abréviations

µl	:	microlitre
ADN	:	Acide désoxyribonucléique
AST	:	Agar Salty Tween
ATCC	:	American type culture collection
C	:	Celsius
CAT	:	Capacité Antioxydante Totale
CMB	:	Concentration Minimale Bactéricide
CMF	:	Concentration Minimale Fongicide
CMI	:	Concentration Minimale Inhibitrice
DMSO	:	Diméthylsulfoxyde
DPPH	:	1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle
ExtAq	:	Extrait Aqueux
ExtHE	:	Extrait Huiles essentielles
ExtHex	:	Extrait Hexnique
ExtMeOH	:	Extrait méthanolique
g	:	gramme
GN-NaCl	:	Gélose nutritif - NaCl
GRH	:	Globules rouges humain
h	:	heurs
HE	:	Huiles essentielles
IC50	:	concentration qui correspond à 50% d'inhibition
km	:	kilomètre
LBPVBP	:	laboratoire de Biotoxicologie, Pharmacognosie et Valorisation Biologiques des Plantes
LDL	:	lipoprotéines de basse densité
mg	:	Milligramme
MH	:	Mueller Hinton
min	:	minute
ml	:	Millilitre
mM	:	Mili mole
Mm	:	millimètre
MS	:	Matière sèche
PBS	:	solution tampon phosphate
PCO	:	oxydation photocatalytique
PDA	:	Potato Dextrose Agar
R2	:	Coefficient de corrélation
RL	:	Radical Libre
tr	:	tour
UFC	:	Unité formant colonies
UV	:	Ultraviolets
ABTS	:	acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)
RL	:	Radicaux libres

Introduction générale

Les plantes médicinales sont utilisées depuis l'antiquité, pour soulager et guérir les maladies humaines. En fait, leurs propriétés thérapeutiques sont dues à la présence de centaines des composés naturels bioactifs appelés: les métabolites secondaires. Ces derniers sont accumulés dans différents organes et parfois dans des cellules spécialisées de la plante (**Nawaz et al., 2006**).

Même avec le progrès de la pharmacologie, l'usage thérapeutique des plantes médicinales est très présent dans certains pays du monde et surtout les pays en voie de développement, en l'absence d'un système médical moderne (**Tabuti et al., 2003**). Pour ces raisons, l'étude des activités biologiques des substances issues des plantes en vue de leurs applications à la santé humaine demeure une tâche intéressante et utile (**Benmansour, 2016**).

L'Algérie recèle d'un patrimoine végétal important par sa richesse et sa diversité à cause de sa position géographique (**Emberger, 1971**). Parmi ces ressources naturelles; les plantes aromatiques et médicinales qui occupent une large place et jouent un grand rôle dans l'économie nationale. Elles sont utilisées dans différents domaines: industrie alimentaire, conserverie, pharmaceutique, et phytothérapie (**Duraffourd, 1997**).

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressées à l'étude de l'espèce médicinale, appartenant au genre *Artemisia*, et la famille des Astéracées, *Artemisia campestris* qui appartient à la flore algérienne et qui est reconnue pour son utilisation médicinale diverse (**Djidjel et al., 2009**).

L'objectif de notre travail s'adresse à la valorisation de la plante aromatique et médicinale utilisée en médecine traditionnelle *Artemisia campestris* et l'évaluation de quelques activités biologiques de ses extraits.

Afin de réaliser cette étude, les objectifs suivants ont été fixés :

- La caractérisation des composés phytochimiques des extraits d'*Artemisia campestris* par les tests de screening.
- L'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits et des huiles essentielles d'*Artemisia campestris* par la méthode de diffusion de disques et les méthodes de détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et les concentrations minimales bactéricides (CMB) et (CMF) vis-à-vis six souches bactériennes et trois espèces fongiques (levures) ainsi que l'évaluation de l'activité fongique contre quatre espèces fongiques (champignons).

- L'étude de mécanismes d'actions de l'extrait méthanolique d'*Artemisia campestris* à différentes concentrations vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* par les tests de la variabilité cellulaire, tolérance au sel et l'activité des lipases.
- Etude de la cytotoxicité des extraits d'*Artemisia campestris* vis-à-vis les érythrocytes.
- Evaluation du pouvoir antioxydant par deux méthodes : capacité antioxydante totale et le test de piégeage du radical DPPH.

Ce manuscrit est divisé en trois parties :

- ❖ La première partie est consacrée à une étude bibliographique. Nous avons entamé cette partie par des généralités sur les plantes médicinales et une présentation et les aspects botaniques et phytochimiques de la plante étudiée, ses activités biologiques, et enfin les mécanismes d'action des antimicrobiens.
Cette partie comporte quatre chapitres :
 - **Chapitre I** : *Généralités sur les plantes médicinales*
 - **Chapitre II** : *Présentation de la plante étudiée*
 - **Chapitre III** : *Activités biologiques d'Artemisia campestris*
 - **Chapitre IV** : *Mécanisme d'action des antimicrobiens*
- ❖ Dans la deuxième partie, qui correspond à la méthodologie, nous présenterons nos stations d'études, notre matériel végétal (les parties du végétale traitées ainsi que les périodes d'échantillonnage) et nous exposerons les différentes méthodes utilisées dans notre partie pratique pour l'extraction et les tests phytochimiques, l'extraction des huiles essentielles ainsi que les tests de l'activité antimicrobienne et le mécanisme d'action d'*Artemisia campestris*, pouvoir antioxydant et la cytotoxicité vis-à-vis les globules rouges.
- ❖ Nous présenterons et discuterons les résultats obtenus dans la troisième partie de ce travail.
- ❖ Enfin, nous terminerons par une conclusion générale

Synthèse bibliographique

Chapitre I :
Généralités sur les plantes médicinales

1. Définition des plantes médicinales :

Une plante médicinale regroupe l'ensemble des plantes dont un ou plusieurs de leurs organes sont utilisés pour leurs vertus thérapeutiques. Il peut s'agir de la tige, des feuilles, de l'écorce ou encore des racines qui sont employées à des fins curatives (**Hodré, 2014**). Par suite, la pharmacopée européenne définit une plante médicinale comme une drogue végétale dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses, l'expression drogue végétale ou, plus couramment, drogue, désigne donc une matière première naturelle servant à la fabrication des médicaments (**Debuigne, 1974**).

Les plantes médicinales peuvent être des plantes spontanées, qui sont des plantes difficiles à cultiver, et elles représentent encore, d'après certaines firmes importatrices, 60 à 70 % des drogues du marché européen. Quant à la valeur médicinale des plantes spontanées, elles varient suivant l'origine, le terrain et les conditions de croissance (**Bezanger et al., 1975**). Secondement, les plantes cultivées, leur culture évite ces inconvénients. Elle assure une matière première en quantité suffisante, homogène au double point de vue aspect et composition chimique (**Chaberier, 2010**).

2. Phytothérapie :

La phytothérapie est le traitement des pathologies bénignes par les plantes médicinales, celles-ci sont consommées en l'état (tisanes) après leurs transformations en poudres, extraits... (**Moatti, 1983**). La législation française impose que les plantes médicinales et les médicaments de la phytothérapie ne présentent que pas ou peu : de risque de surdosage, de toxicité, d'associations dangereuses (**Chaberier, 2010**).

3. Propriétés et vertus thérapeutiques des plantes médicinales :

Les plantes biosynthétisent deux types des composés chimiques, il s'agit des métabolites primaires et métabolites secondaires. Les premiers sont indispensables à l'existence des plantes (protéines, lipides et hydrates de carbone) et servent à la subsistance et à la reproduction, non seulement à la plante elle-même mais encore à d'autres êtres vivants [(**Elbidi, 2016**) ; (**Fouché et al., 2002**)]. Cependant, les métabolites secondaires, au moins à l'état pur et à certaines doses, ont des propriétés médicinales ou peuvent être toxique. Toutefois, il ne s'ensuit pas nécessairement que les mêmes composés sont aussi toxiques ou bénéfiques lorsqu'ils se

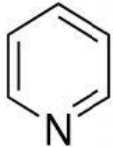
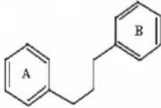
trouvent dans la plante ou lorsqu'ils sont en extraits, car il peut y avoir des effets synergiques des composés chimiques dans la plante (**Maurice, 1997**).

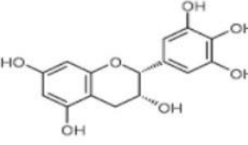
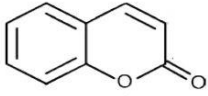
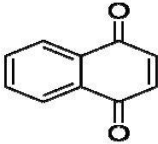
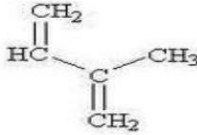
4. Métabolites secondaires :

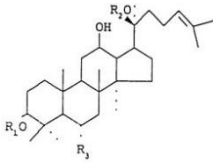
Les métabolites secondaires sont des molécules complexes synthétisées par les plantes supérieures (**Boudjouref, 2011**), ils n'exercent pas de fonction directe au niveau des activités fondamentales de la plante (**Guignard, 1996**), par contre, ils interviennent dans l'adaptation de la plante à son environnement (**Judd, 2002**), ainsi que la régulation des symbioses, la défense contre les prédateurs et les pathogènes et contribuant également à la survie de l'organisme dans son écosystème (**Peeking et al., 1987**). Leur incorporation dans l'alimentation humaine peut être utile pour la prévention contre plusieurs maladies comme les maladies circulatoires, les inflammations, les infections... (**Makkar et al., 2007**).

Chez les végétaux, ces composés secondaires regroupent des dizaines de milliers de molécules différentes classées en familles chimiques telles que les polyphénols, les terpènes, les alcaloïdes etc... (**Tableau 01**) (**Elkolli, 2017**).

Tableau 01 : définition et propriétés des principaux composés qui représentent les métabolites secondaires

Métabolite secondaire	Définition	Propriétés	Structure chimique	Références
Les alcaloïdes	Ils sont des composés azotés complexes généralement d'un effet physiologique puissant. Ce sont pour la plupart des poisons végétaux très actifs, dotés d'une action spécifique. Les alcaloïdes sont des hétérocycliques à caractère alcalin contenus essentiellement dans les plantes.	Ils possèdent une activité pharmacologique et thérapeutique significative notamment au niveau de système nerveux central, système nerveux autonome et du système cardiovasculaire, jouent un rôle écologique de défense contre des herbivores.	 Pyridine	[(Gazengel et Orecchioni, 2013) ; (Khenaka, 2011) ; (Ouahas, 1996)]
Les flavonoïdes	Le terme flavonoïde désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols, souvent responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. À l'état naturel les flavonoïdes se trouvent le plus souvent sous forme d'hétérosides.	Possèdent une forte activité antioxydante, ils sont capables de diminuer la perméabilité des capillaires sanguins et de renforcer leur résistance, possèdent des propriétés antimicrobiennes par l'inhibition des enzymes extracellulaires microbiennes.		[(Bruneton, 1999) ; (Ghestem et al., 2008) ; (Harborne et Williams, 2000) ; (Meddelton et al., 1993) ; (Peterson, 1998) ; (Seyoum et al., 2006)]

Les tanins	Ils sont des composés polyphénoliques de structures variées, non azoté et ayant en commun la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et les protéines.	Ils ont un très grand pouvoir antibactérien, anti-inflammatoire, Les plantes riches en tanins sont utilisées dans les cas de rhume, de maux de gorge.		[(Bassene <i>et al.</i> , 1995) ; (Khanbabae et Ree, 2001) ; (Mota <i>et al.</i> , 1985) ; (Nonaka <i>et al.</i> , 1990) ; (Paolini <i>et al.</i> , 2003)]
Les coumarines	Ils sont des hétérocycles oxygénés ayant comme structure de base le benzo-2- pyrone, elles sont responsables de l'odeur caractéristique du foin.	Anti-agrégation plaquettaire, anti- inflammatoire, anti-coagulante, anti-tumorale diurétiques, antimicrobienne.		[(Cowan, 1999) ; (Ochocka <i>et al.</i> , 1995) ; (Ojala <i>et al.</i> , 2002) ; (O'Kennedy et Thornes, 1997) ; (Taguchi <i>et al.</i> , 2002)]
Les quinones	Des composés oxygénés qui correspondent à l'oxydation de dérivés aromatiques.	Les plantes l'utilisent pour transporter les électrons dans les membranes de la mitochondrie, soignent les troubles de l'intestin grêle, ils sont reconnus comme un pesticide naturel.		[(Bruneton, 1993) ; (Harbone, 1998) ; (Guignard <i>et al.</i> , 1995)]
Terpénoïdes	Hydrocarbures naturels, de structure cyclique ou de chaîne ouverte, leur variation structurelle justifie l'existence de nombreux alcools, aldéhydes, cétones, éthers, esters, phénols.	Leur présence signifie que les plantes sont une bonne source en substance antimicrobiennes.		[(Hellal, 2011) ; (Mohammedi, 2013) ; (Braz et Mohamed Hanchour, 2018)]

<p>Les saponines</p>	<p>Les saponosides sont une classe d'hétérosides qui ont la propriété de former des solutions moussantes en présence d'eau.</p>	<p>Irritent les muqueuses, causant un relâchement intestinal, employées comme désinfectantes des voies urinaires, ont une propriété d'hémolyser les globules rouges ce qui explique l'effet toxique de certaines d'entre elles, qui les rend inconsommables</p>		<p>[(Elbidi, 2016) ; (Malne <i>et al.</i>, 1980) ; (Sebaa, 2008)]</p>
----------------------	---	---	---	---

5. Modes de préparation des extraits des plantes médicinales :

Les métabolites secondaires se caractérisent généralement par des faibles concentrations dans les tissus végétaux et donc pour assurer leurs actions il est nécessaire de traiter la plante, de la transformer pour tirer ces substances (**Elbidi, 2016**). Etant donné la multiplicité des composants constituant les principes actifs de chaque plante et la spécificité d'action de chacun d'entre eux, il est exigible d'élaborer des méthodologies diverses qui permettent, selon le but recherché, leur extraction (**Chiej, 1982**). Les méthodes d'extraction, des métabolites secondaires, les plus utilisées sont: l'infusion, la décoction et la macération (**Elbidi, 2016**).

- **Infusion :**

L'infusion est la forme de préparation la plus simple, elle est appliquée généralement sur les organes délicats de la plante : fleurs, feuilles aromatiques, sommités. Cette forme permet d'assurer une diffusion optimale des substances volatiles : essences, résines, huiles (**Lehout et Laib, 2015**). L'infusion est préparée en versant de l'eau bouillante sur une quantité spécifique de matière végétale, il s'agit d'un procédé semblable à la préparation d'un thé commun dans une théière (**Sofowora, 2010**).

- **Décoction :**

Cette préparation s'opère en faisant bouillir les plantes, le plus souvent dans de l'eau, parfois dans l'alcool. Elle convient surtout aux écorces, aux racines, tiges et fruits (**Djabou, 2006**).

- **Macération :**

Les macérations concernent généralement les plantes dont les substances actives risquent de disparaître ou de se dégrader sous l'effet de la chaleur (par ébullition). Elles peuvent être définies comme des infusions froides (**Elbidi, 2016**), cette préparation s'obtient en mettant les plantes, en contact, à froid, avec un liquide qui peut être de l'alcool, de l'eau ou d'autres solvants (**Djabou, 2006**). Le temps de contact est parfois très long, en effet, les plantes aromatiques ou amères devront macérer entre deux et douze heures. Les macérations à l'eau sont plus rarement employées, car elles ont l'inconvénient de fermenter facilement (**volack, 1983**).

En dehors des trois préparations classiques des plantes médicinales par les procédés d'infusion, de macération et de décoction (**Djabou, 2006**), on utilise encore les plantes sous forme de :

- Cataplasme : qui est utilisé en applications externes pour traiter essentiellement les foulures, les brûlures, les ulcérations, certaines plaies, les inflammations, les douleurs nerveuses ou musculaires, certaines formes rhumatismales (**Elbidi, 2016**).
- Poudre : les plantes desséchées (entières ou feuilles, graines, racines ou écorces) sont broyées, puis incorporées aux aliments (**Abdelouahid, 2010**).
- Fumigation : on fait bouillir ou brûler des plantes, de façon à bénéficier de propriétés thérapeutiques des vapeurs ou fumées produites, ces vapeurs des plantes aromatiques ont un grand pouvoir désinfectant (**Debuigue, 1984**).

6. Huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont des mélanges de substances chimiques volatiles et aromatiques (**Iserin, 2001**), ces substances appartiennent à la famille des terpènes : monoterpènes et sesquiterpènes (C10 et C15), donc, d'un point de vue chimique chaque huile essentielle contient un mélange extrêmement complexe de composants comme esters, cétones et d'autres éléments ce qui rend la plupart encore difficile à identifier [(**Philippson, 1995**) ; (**Wang et al, 2006**)]. Les huiles essentielles sont réparties dans un nombre limité de familles dans lesquelles Apiacées, Myrtacées, Rustacées, Astéracées, Cupressacées et Poacées (**Gerhard, 1993**). Elles sont extraites à partir des diverses parties de plantes : fleurs, racines, feuilles, tiges, écorces ou graines (**Iserin, 2001**). Elles ne participent pas directement à la croissance des plantes, mais ont évolué pour leur fournir une protection naturelle contre les attaques de microbes ou d'insectes (**Guinoiseau, 2010**).

6.1. Méthodes d'extraction des huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont des produits obtenus soit à partir des matières premières naturelles par distillation, soit par des procédés mécaniques ou des procédés physiques (**Stahl-Biskup et Saez, 2002**). Elles sont extraites principalement par deux méthodes de distillation (entraînement à la vapeur d'eau et hydrodistillation) et une méthode d'expression à froid (cas particulier des agrumes). Lesquelles peuvent être mises en œuvre sur les systèmes discontinus ou continus, à la pression ambiante, en surpression ou en dépression [(**Romdhane et Tizaoui, 2005**) ; (**McDonald et al., 2016**)] (**Tableau 02**).

Tableau 02 : méthodes d'extraction des huiles essentielles

Méthode d'extraction	Principe	Références
Extraction par entraînement à la vapeur d'eau	<p>L'entraînement à la vapeur d'eau est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles. A la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct de l'eau et la matière végétale à traiter. La vapeur d'eau fournie par une chaudière traverse la matière végétale située au-dessus d'une grille. Durant le passage de la vapeur à travers le matériel, les cellules éclatent et libèrent l'huile essentielle qui est vaporisée sous l'action de la chaleur pour former un mélange « eau + huile essentielle ». Le mélange est ensuite véhiculé vers le condenseur et l'essencier avant d'être séparé en une phase aqueuse et une phase organique.</p> <p>Avantage du procédé : L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile</p>	(El haib, 2011)
Extraction par hydrodistillation	L'hydrodistillation consiste à immerger la matière première dans un bain d'eau. L'ensemble est porté à ébullition, elle est généralement conduite à pression atmosphérique.	(Lucchesi, 2005)
L'hydrodistillation assistée par micro-ondes	<p>Il existe divers exemples d'applications de cette technique à l'extraction de certains organes végétaux : feuilles de <i>Pistacia lentiscus L.</i>, épices de <i>Cuminum cyminum L.</i> et <i>Zanthoxylum bungeanum L.</i>, fruits de thym.</p> <p>Avantage du procédé : la réduction a la durée de distillation (ramenée à quelques minutes) et incrémente le rendement d'extrait.</p>	[(Bahrami <i>et al.</i> , 2013) ; (Ben douissa <i>et al.</i> , 2005) ; (Wang <i>et al.</i> , 2006)]
Hydrodiffusion	C'est une variante de l'entraînement à la vapeur. Le flux de vapeur n'est pas ascendant mais descendant. Cette technique exploite ainsi l'action osmotique de la vapeur d'eau. Le principe de cette	(Lucchesi, 2005)

	<p>méthode réside dans l'utilisation de la pesanteur pour dégager et condenser le mélange « vapeur d'eau-huile essentielle » dispersé dans la matière végétale.</p> <p>Avantage du procédé : l'hydrodiffusion permet une économie d'énergie due à la réduction de la durée de la distillation et donc à la réduction de la consommation de vapeur</p>	
Expression à froid	<p>L'extraction par expression à froid, est souvent utilisée pour extraire les huiles essentielles des agrumes. Son principe consiste à rompre mécaniquement les poches à essences. L'huile essentielle est séparée par décantation ou centrifugation. D'autres machines rompent les poches par dépression et recueillent directement l'huile essentielle.</p> <p>Avantage du procédé : absence des dégradations liées à l'action de l'eau à cause de processus de ses machines.</p>	(Nzeyumwami, 2004)
Extraction par solvant organique	<p>La technique d'extraction par solvant, consiste à placer dans un extracteur un solvant volatil et la matière végétale à traiter. Grâce à des lavages successifs, le solvant va se charger en molécules aromatiques, avant d'être envoyé au concentrateur pour y être distillé à pression atmosphérique. Le produit ainsi obtenu est appelé « concrète ». Cette concrète pourra être par la suite brassée avec de l'alcool absolu, filtrée et glacée pour en extraire les cires végétales. Les rendements sont généralement plus importants par rapport à la distillation.</p>	(El Haib, 2011)
Extraction par du CO ₂ à l'état supercritique	<p>L'extraction par gaz liquéfié ou par fluide à l'état supercritique met en œuvre généralement le dioxyde de carbone. Dans ce système le solvant est utilisé en boucle par interposition d'échangeurs de chaleur, d'un compresseur et d'un détendeur afin de porter le solvant à l'état désiré à chaque stade du processus. La séparation de l'extrait a lieu en phase gazeuse par simple détente.</p> <p>Avantage de ce procédé : la possibilité d'éliminer et de recycler le solvant par simple compression détente. De plus les températures d'extraction son basses dans le cas de dioxyde de carbone et non agressives pour les constituants les plus fragiles.</p>	[(Braga <i>et al.</i> , 2005) ; (Lagunez rivera, 2006)]

6.2. Méthodes d'identification des huiles essentielles :

L'identification des constituants d'un mélange complexe naturel s'effectue selon trois voies :

- **La voie A** : elle est spécialement adaptée aux analyses de routine telles que les contrôles de qualité d'échantillons, elle fait intervenir le couplage d'une technique chromatographique (CPG, CLHP), qui permet l'individualisation et la quantification des constituants, avec une technique spectroscopique (SM, IRTF, etc.), qui permet leur identification par comparaison de leurs données spectrales avec celles des produits connus (**Joulain, 1994**).
- **La voie B** : elle est préconisée lorsque les constituants d'un mélange présentent des difficultés d'identification (structures d'un nouveau composé et/ou structures très proches). Deux étapes sont nécessaires : après purification/isolément des composés par différentes techniques chromatographiques, une analyse structurale est réalisée en s'appuyant sur la RMN du ^1H et du ^{13}C (**Arabi, 2018**).
- **La voie C** : intermédiaire entre les deux précédentes, met en œuvre la Résonance Magnétique Nucléaire du ^{13}C (RMN) sans séparation ou fractionnement préalable des composés [(**Delphin, 2013**) ; (**Kubeczka, 1982**)].

6.3. Propriétés d'utilisation des huiles essentielles :

De nos jours, le domaine qui utilise les huiles essentielles pour traiter une maladie s'appelle l'aromathérapie. Il est donc important de se renseigner sur les effets thérapeutiques des huiles essentielles car leur usage peut comporter des avantages ou des inconvénients (**Arabi, 2018**). Outre ces propriétés principales, elles ont toute une vertu ; antivirale, antifongique, antiparasitaire et antiseptique. Elles ont aussi des activités insecticides car elles ne sont pas toxiques pour les plantes et sont facilement dégradables (**Mahadevan, 1982**), anti-brûlures et cicatrisantes, analgésiques, antalgique et anesthésique, des propriétés cardiovasculaires, digestives et anti-inflammatoires (**Baratta et al., 1998**). Elles sont très efficaces contre les moisissures responsables des denrées alimentaires lors de leurs stockages (**Mejhohm, 2002**). Ainsi que des activités antioxydantes et antimicrobiennes sur plusieurs bactéries responsables de la pollution des aliments et pourraient servir d'agents de conservation alimentaires (**Kim et al., 1995**).

6.4. Conditions de conservation des huiles essentielles :

La relative instabilité des molécules constitutives des huiles essentielles implique des précautions particulières pour leur conservation. En effet, les possibilités de dégradation sont nombreuses, facilement objectivées par la mesure d'indices chimiques (indice de peroxyde, indice d'acide...), par la détermination de grandeurs physiques (indice de réfraction, pouvoir rotatoire, miscibilité à l'éthanol, densité...) et/ou par l'analyse chromatographique (**Rastogi, 1998**). Les conséquences sont multiples par exemple, photo-isomérisation, coupure oxydative, peroxydation et décomposition en cétones et alcools, thermo-isomérisation, hydrolyse, transestérification. Ces dégradations pouvant modifier les propriétés et /ou mettre en cause l'innocuité de l'huile essentielle, il convient de les éviter par l'utilisation de flacons propres et secs en aluminium vernissé, en acier inoxydable ou en verre teinté anti-actinique, presque entièrement remplis et fermés de façon étanche (l'espace libre étant rempli d'azote ou d'un autre gaz inerte), stockage à l'abri de la chaleur et de la lumière. Dans certains cas, un antioxydant approprié peut être ajouté à l'huile essentielle. Dans ce cas, cet additif est à mentionner lors de la vente ou l'utilisation de l'huile essentielle [(**norme AFNOR NF T 75-001, 1996**) ; (**norme NF 75-002, 1996**)].

Chapitre II :
Présentation de la plante étudiée
Artemisia campestris

L'armoise, *Artemisia campestris* est une plante spontanée très connue en Algérie et très utilisée par sa population locale en médecine traditionnelle. Plus d'une dizaine d'armoises sont répertoriées en Algérie, certaines sont très rares dans les hautes montagnes (Djidel et al., 2009). En revanche, d'autres sont très répandues et abondantes dans les régions steppiques et sahariennes. Sa détermination est très connue des populations, car elle est vivace et d'une odeur aromatique très caractéristique. Cette armoise champêtre est très connue dans le Nord, dans les Hauts-Plateaux et dans l'Atlas saharien (Quezel, 1963).

1. Présentation de la famille des Astéracées :

La famille d'Astéracée contient plus de 500 espèces réparties en 300 genres [(Megdiche-Ksouri et al., 2014) ; (Watson et al., 2002);]. Les Astéracées sont distribuées dans le monde entier, mais sont particulièrement abondantes dans les milieux rudes, secs et montagneux (Grimaud, 2009). Toutes sont caractérisées biochimiquement par l'inuline qui représente leur principal glucide de réserve. Cette famille est également caractérisée par un goût et une odeur provoquée par les monoterpènes et les sesquiterpènes et une variété de métabolites secondaires (Gouveia et al., 2013) Enfin, les botanistes les considèrent comme les plantes les plus évoluées parmi les dicotylédones car elles sont pourvues d'un appareil sécréteur bien développé (Grimaud, 2009).

2. Présentation du genre *Artemisia* :

Le genre *Artemisia* est l'un des genres les plus importants et les plus répandus de la famille des Astéracées à cause de son hétérogénéité et donc la variété de ses composés phytochimiques principalement les terpénoïdes, les flavonoïdes, les coumarines, les stérols et les acétylènes [(Mehrdad et al., 2007) ; (Singh, 2011)]

Artemisia est un genre taxonomiquement compliqué car certaines espèces ont des formes différentes et d'autres se ressemblent morphologiquement, ce qui rend l'identification d'un échantillon sans examen morphologique détaillé très difficile. Les espèces d'*Artemisia* sont principalement des herbes, et parfois des arbustes et généralement à fort arôme, le corps végétal est souvent poilu. Les feuilles sont pinnatifides avec des dimensions variables. Les fleurs sont bisexuées (Ghafoor, 2002).

Dans la flore de l'Algérie, ce genre est représenté par 11 espèces spontanées parmi lesquelles se trouve *Artemisia campestris* (Quezel, 1963).

3. Présentation de l'espèce *Artemisia campestris* :

3.1. Nomenclature :

- Nom scientifique : *Artemisia campestris*
- Nom français : Armoise champêtre, Armoise des champs
- Nom anglais : Field wormwood, Field sagewort, Field Southernwood
- Nom arabe : Chih Al-Hakli شيح الحقلي
- Nom Local : Chehiba en ouest algérien et le nord, ou Chiba en Quelques régions du sud algérien.

Les noms communs par (Leger, 2007)

3.2. Systématique de la plante :

D'après la classification du département américain d'agriculture de service de conservation des sources naturelles en 2012 (Natural resource conservation service, USA Dept. Of Agriculture), *Artemisia campestris* occupe la classification suivante :

Règne	Plantae
Sous – règne	Tracheobionta
Embranchement	Spermatophyta
Sous – embranchement	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous classe	Asteridae
Ordre	Asterales
Famille	Asteraceae
Genre	<i>Artemisia</i>
Espèce	<i>Artemisia campestris</i>

3.3. Description botanique d'*Artemisia campestris* :

Artemisia campestris est un arbuste aromatique à tiges robustes et ligneuses à la base striée, d'une hauteur de 30 à 80 cm (Elbidi, 2016) presque ligneuse et couchée à la base, ascendante, glabre à l'état adulte, très rameuse, à rameaux étalés. Elle a des feuilles caulinaires, vertes souvent argentées, soyeuses, les inférieures pétiolées, les suivantes sessiles, à segments très étroits et linéaires et les parties supérieures sont les plus simples (Julve, 2011 et Chalchat, 2003) (Figure 01).



Figure 01 : Partie aérienne d'*Artemisia campestris* (tirée du site botanique www.jardindupicvert.com)

3.4. Composition chimique d'*Artemisia campestris* :

Des analyses chimiques réalisées sur *Artemisia campestris* ont montré un ensemble diversifié et riche de composés phytochimique notamment des alcaloïdes, des saponines, des terpènes et des flavanones (pinostrobin, pinocembrine, sakuranétine et naringine), un dihydroflavonol (7-méthylaromadendrine) et une flavone (hispiduline) (Hurabielle, 1982). D'autre part, autre études chimiques ont révélé que la partie aérienne d'*Artemisia campestris* est riche en β -myrcène (16,47%), de l' α -pinène (14,18%), du trans β -ocimène (12,61%), du β -cymène (8,15%) et du camphre (5,85%) (Al Snafi, 2013) (Tableau 03).

L'extrait obtenu par l'hexane des feuilles d'*Artemisia campestris* a montré une forte teneur en acides gras, dont les plus importants sont : γ - acide linoléique, acide linoléique, acide oléique, acide palmitique et acide arachidique (Carvalho et al., 2011), similairement à ces données, la partie aérienne d'*Artemisia campestris* de Tunisie possède une composition similaire en acides gras, constituée principalement de l'acide palmitique, acide linoléique et linoléique (Tammam et al., 2015), la petunidin-3-O-acétylglucoside était le seul antocyanine contenu dans l'extrait méthanolique de la partie aérienne d'*Artemisia campestris* (Megdiche-Ksouri et al., 2015).

Tableau 03: Composition chimique (%) l'huile essentielle issue de la partie aérienne d'*Artemisia campestris* de l'Algérie [(Aloui et al., 2016) ; (Bakchiche et al., 2014) ; (Belhattab et al., 2011) ; (Boutemak et al., 2016) ; (Essid et al., 2015) ; (Houicher et al., 2016) ; (Jaouadi et al., 2016).]

Composition	Pourcentage (%)
β -pinène	6,1 - 32,95
α -pinène	9,9 - 24,98
α -terpényl acétate	18,8
β -myrcène	7,78 - 17,34
Sabinène	17
Limonène	6,6 - 15,13
germacrène D	7,1 - 10,6
(Z, E)-farnesol	10,3
Camphre	9,2
γ -terpinène	7,6
o-cymène	6,79

Tableau 04 : Composition chimique (%) l'huile essentielle issue de la partie aérienne d'*Artemisia campestris* de la Tunisie [(Akrouit et al., 2001) ; (Akrouit et al., 2003) ; (Akrouit et al., 2007) ; (Akrouit et al., 2010) ; (Akrouit et al., 2011) ; (Akrouit et al., 2012)].

Composition	Pourcentage (%)
β -pinène	24 - 49,8
p-cymène	2,3 - 22,3
Apinène	4,1 - 12,5
Camphre	10,3
Spathuléol	1,2 - 10
γ -muurolène	0,5 - 9,6
Limonène	4,9 - 93

3.5. Répartition géographique d'*Artemisia campestris* :

Artemisia campestris est originaire de l'Asie, et elle est maintenant distribuée en Amérique du Nord et dans de vastes régions d'Asie et d'Afrique du Nord [(Dob et al., 2005) ; (Gleason., 1963)].

Elle est qualifiée de couvrir une large surface écologique, qui s'étend de l'étage thermo-méditerranéen jusqu'à l'étage montagnard méditerranéen et depuis les zones sahariennes jusqu'aux zones humides (Subally, 2002). Généralement, *Artemisia campestris* pousse dans des habitats ouverts tels : les prairies, les pinèdes, les clairières et les sommets, et elle s'accroît dans les sols secs, souvent comme une espèce rudérale (Nobis et al., 2014).

Les principaux pays où règne cette plante sont : 12 espèces présentes en Maroc (Elachouri et al., 2014), l'Algérie a plus de 11 espèces (Boumar et al., 2014), la Tunisie (Akrouf et al., 2001), 5 en Libye et 4 en Égypte (Ouyahya, 1990).

3.6. Utilisations traditionnelles d'*Artemisia campestris* :

Artemisia campestris est traditionnellement utilisée comme herbe médicinale en particulier dans le traitement des inflammations, des maladies du sang, du soulagement de la toux, de la douleur et des infections bactériennes (Megdiche-Ksouri et al., 2014). Elle est aussi indiquée pour soulager les maladies urinaires, rénales et hépatiques au Japon, et en Tunisie [(Aniya et al., 2000) ; (Ben Sassi et al., 2007)], comme remède d'amaigrissement (Ouelbani et al., 2016).

En Algérie *Artemisia campestris* est aussi utilisée pour traiter les troubles digestives, les ulcères et les douleurs menstruelles (Dob et al., 2005), préconisée comme fébrifuge et comme régulateur de la circulation et surtout comme soin post-partum (Boulanouar et al., 2013), les utilisations de la plante *Artemisia campestris* sont représenté dans le **tableau 05**.

Tableau 05 : Parties utilisées, mode de préparation et utilisations traditionnelles d'*Artemisia campestris*

Pays	Parties utilisées	Préparation	Utilisations traditionnelles	Références
Algérie	Feuilles, tiges, partie aérienne	Infusion, décoction, cataplasme, poudre, tisane, thé	Affections cutanées, gastro-intestinales, vulnérable, régulateur de la circulation, fébrifuge, vermifuge, pour les soins post-partum, sédative, antivenin, contre la calvitie, pour l'amaigrissement, soin des goîtres...	[(Benarba et al., 2015) ; (Benchelah et al., 2004) ; (Benderradji et al., 2014) ; (Boudjelal et al., 2013) ; (Boulanouar et al., 2013) ; (Chermat et al., 2015) ; (Djidel et al., 2009)]
Maroc	Feuilles, partie aérienne, graines	Infusion, décoction, cataplasme	Antidiabétique, troubles métabolique, oculaire, cutanées (mélasma), digestives, respiratoires et allergiques...	[(Bammou et al., 2015) ; (Bnouham et al., 2002) ; (El Hassani et al., 2013) ; (Fakchich et al., 2014)]
Tunisie	Feuilles, partie aérienne	Décoction	Antivenin, anti-inflammatoire, anti-rhum, anthelminthique, anti-eczéma, fébrifuge, antitussive, contre les infections urinaires, et les problèmes digestifs et cutanés, tonique	[(Ben Sassi et al., 2007) ; (Benderradji et al., 2014) ; (Tili et al., 2013)]
Espagne	Feuilles	Non spécifié	Contre la calvitie	(Benítez et al., 2010)
Japon	Non spécifié	Non spécifié	Affections hépatiques et rénales, antidiabétique	(Aniya et al., 2000)
Canada / états unis	Feuilles, racines	Cataplasme, infusion, thé	Abortive, problèmes digestifs, respiratoires et cutanées	(Shemluck, 1982)

Chapitre III :
Activités biologiques d'Artemisia campestris

En plus de son utilisation traditionnelle, *Artemisia campestris* possède de nombreuses propriétés biologiques grâce à la présence de métabolites secondaires riches de molécules bioactives [(Abderrazak et Joël, 2007) ; (Lutge et al., 2002)].

1. Généralité sur l'activité antimicrobienne :

Les plantes sont une source naturelle d'antimicrobiens et possèdent un système de défense naturelle, qui leur permet de lutter efficacement contre les pathogènes. Pour se protéger contre les bactéries, les champignons et les virus, les plantes synthétisent, de manière constitutive ou induite, une multitude de molécules antimicrobiennes [(Gibbons, 2008) ; (Jones et Dangl, 2006)]. L'originalité de ce système de défense réside dans l'exceptionnelle variabilité chimique des molécules produites qu'elle arbore un vaste réservoir de substances actives [(Gibbons, 2008) ; (Murphy, 1999)]. En effet, une molécule phytochimique est considérée comme « antimicrobienne » si elle inhibe la croissance des micro-organismes pour des concentrations minimales inhibitrices (CMI) comprises entre 100 µg/mL et 1 000 µg/mL (Tegos et al., 2002).

La première mise en évidence de l'action des huiles essentielles contre les bactéries a été réalisée en 1881 par Delacroix (Boyle, 1955), Depuis, de nombreuses huiles ont été définies comme antibactériennes (Burt, 2004).

Les activités antifongiques de nombreuses huiles essentielles, incluant les huiles de thym, de citronnelle, de cannelle et de l'arbre à thé (Burt, 2004) ont montré une grande efficacité contre la levure pathogène *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium oxysporum* et d'autres levures et champignons pathogènes [(Candan et al., 2003); (Martin et al., 2000)].

1.1. Activité antibactérienne d'*Artemisia campestris* :

Un grand nombre d'études a été fait sur l'activité antimicrobienne d'*Artemisia campestris*. Megdiche-Ksouri et al. (2014) ont montré dans leurs travaux l'activité inhibitrice de l'extrait méthanolique d'*Artemisia campestris* contre *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 et *Bacillus thuringiensis* DH 106 avec un diamètre de 13 mm et 18.3 mm respectivement. Tout comme Karabegovic' et al. (2011) qui ont montré que les extraits méthanoliques de cette plante possèdent une activité antibactérienne relativement élevée, ce qui peut être attribué à la richesse de cette espèce sur les composés de la quercétine. Naili et al. (2010) ont rapporté aussi un effet inhibiteur appréciable de l'extrait méthanolique d'*Artemisia campestris* de la Lybie sur *Bacillus subtilis* avec une zone de 32.0 mm et une CMI de 12.5 µg/ml et sur *Staphylococcus aureus*

avec une zone de 27.0 mm et une CMI de 12.5 µg/ml. L'extrait méthanolique de la partie aérienne d'*Artemisia campestris* du Maroc n'exerçait une activité antibactérienne que contre les bactéries à gram positif, sans effet antagoniste sur les espèces bactériennes à gram négatif (Bnouham et al., 2002).

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Artemisia campestris* de la wilaya de Sétif a été testée contre *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* et *Staphylococcus aureus*. La meilleure activité antibactérienne a été obtenue contre *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* avec des zones d'inhibition de 23 mm et 20 mm, respectivement (Djidel et khennouf, 2014). Cependant, les huiles essentielles ont montré une faible activité inhibitrice contre deux bactéries phytopathogènes *Klebsiella pneumoniae* avec une zone d'inhibition de 16 mm, et *Staphylococcus aureus* avec une zone d'inhibition de 11 mm (Ghorab et al., 2013).

1.2. Activité antifongique d'*Artemisia campestris* :

Une efficacité antifongique significative pour plusieurs extraits d'*Artemisia campestris* contre nombreuses espèces fongiques a été mise en évidence. Lors d'essais sur les souches *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton rubrum* et *Microsporum canis*, l'extrait aqueux d'*Artemisia campestris* a induit 100% d'inhibition de la croissance, le même résultat a été obtenu avec les standards voriconazole, fluconazole, itraconazole et amphotéricine B (Webster et al., 2008). De plus, il a été constaté que l'extrait méthanolique de tiges possédait des degrés différents d'activité antifongique révélé par différents pourcentages d'inhibition contre *Fusarium oxysporum* (54%), *Aspergillus fumigatus* (47%), *Fusarium verticillioides* (39%), *Penicillium brevicompactum* (31%) et *Aspergillus flavus* (30%) (Zabka et al., 2011), d'ailleurs, l'extrait méthanolique de cette plante a bloqué la croissance d'*Aspergillus niger* et a provoqué une zone d'inhibition d'environ 32,5-33 mm, ce qui est plus important que l'érythromycine 20,5 mm (Karabegović et al., 2011).

Tout simplement, l'effet antifongique de l'huile essentielle n'a été limité que sur la variété *Trichophyton longifus*, pour laquelle l'inhibition de la croissance était de 65%, le même effet antifongique a été observé avec le miconazole (inhibition de 70% de la croissance) (Akrouf et al., 2007). Autre étude a montré importance de l'huile essentielle d'*Artemisia campestris* sur les souches et qui atteint parfois 87 % d'inhibition, *Rhizopus stolonifer* 87,85%, *Fusarium oxysporum* 87,65%, *Aspergillus flavus* 84,46%, *Aspergillus niger* 55,4% en concentration de

200 µl /20 ml (**Gherib, 2009**). Cette activité est du probablement à la présence de certains composés majoritaires comme α -pinène connu pour son activité antifongique (**Martin et al., 2000**).

2. Activité antioxydante :

2.1. Généralité sur l'activité antioxydante :

Les réactions radicalaires sont présentes chez les êtres vivants, et sont impliquées plus ou moins directement dans la reproduction, la modification des gènes et la défense contre les maladies. Les dommages oxydatifs provoqués par le stress oxydant appelé aussi stress oxydatif sont impliqués dans l'étiologie du cancer, des maladies cardiovasculaires et d'autres maladies dégénératives (**Trabsa, 2015**).

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer, in vitro et in vivo ces activités (**Popovici et al., 2009**) telles que : piégeage du radical libre DPPH, piégeage du radical 2, 2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS), blanchiment du β -carotène, capacité antioxydante totale (CAT), pouvoir réducteur du fer, piégeage du radical hydroxyle (OH), piégeage de l'anion superoxyde (O_2^-) et le test sur la chélation des ions Ferriques (**Guillouty, 2016**).

2.2. Stress oxydant :

Le stress oxydant est le terme qui se rapportant au déséquilibre entre la génération des oxydants et l'activité des défenses antioxydantes, qui pourrait mener aux dommages oxydants. C'est une situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive des espèces radicalaire toxiques (**Ríos-Arrabal et al., 2013**).

2.3. Radicaux libres :

Un radical libre (RL) est une espèce chimique possédant, sur sa couche externe, un ou plusieurs électrons célibataires, cet électron lui confère une certaine instabilité et haute réactivité (demi-vie courte) (**Ortiz et al., 2013**). Les espèces radicalaires vont tenter de rapatrier leurs électrons célibataires en agressant toute molécule susceptible de se faire arracher un électron (**Afanas'ev, 2009**). A des concentrations physiologiques, les RLs jouent des rôles dans la signalisation, la migration et la différenciation cellulaire (**Ziech et al., 2010**), mais à des concentrations plus élevées, ils induisent la mort cellulaire et l'apoptose (**Salido et Rosado, 2009**).

2.4. Sources des radicaux libres :

Les cellules sont exposées à des ROS (Reactive oxygen species) ou RNS (Reactive nitrogen species) de sources endogènes au niveau des mitochondries, au cours du transfert d'électron dans la chaîne respiratoire (**Lagourge et Lorsson, 2013**). Les cellules phagocytaires (polynucléaires et macrophages) possèdent une enzyme membranaire, la NADPH oxydase, qui est spécialisée dans la fabrication d' $O_2 \bullet^-$ (**Touyz et al., 2010**), la xanthine oxydase (XO) (**O'Mahony et al., 2013**), les ions métalliques (**Cotticelli et al., 2013**), ou des sources exogènes: le tabagisme, poisons environnementaux, alcool et rayonnement ionisant, les rayonnements ultraviolets (UV) solaire et les différentes expositions aux pesticides (**Pickering et al., 2013**).

2.5. Rôles pathologiques des radicaux libres :

Lors d'un stress oxydant, les RLs non détoxiquées par le système antioxydant attaquent et endommagent les macromolécules contenues dans les cellules par oxydation, notamment les lipides, les protéines et l'acide désoxyribonucléique (ADN) (**Menon, 2014**). L'ADN est une molécule très sensible à l'attaque par les RLs. L'attaque radicalaire peut entraîner l'oxydation des bases, engendrant un grand nombre de bases modifiées, mais le stress oxydant peut aussi attaquer la liaison entre la base et le désoxyribose, créant un site abasique, ou attaquer le sucre lui-même, créant une coupure de chaîne simple brin [(**Burton et Jauniaux, 2011**) ; (**Charbon et al., 2014**)].

2.6. Les Antioxydants :

Un antioxydant peut être défini comme toute substance capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats (**Rahal et al., 2014**).

Vansant (2004) a défini les antioxydants comme substances capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques de ROS. Les antioxydants sont des systèmes enzymatiques ou non-enzymatiques, endogènes ou exogènes.

Les antioxydants les plus connus sont le β -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) ainsi que les composés phénoliques. En effet, la

plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxyphénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydantes sont attribuées en partie à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles et superoxydes (**Hennebelle et al., 2013**).

Ces dernières années, l'intérêt porté aux antioxydants naturels, en relation avec leurs propriétés thérapeutiques a augmenté considérablement. Des recherches scientifiques dans diverses spécialités ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés à partir de plusieurs substances naturelles à savoir, les plantes médicinales et les produits agroalimentaires (**Marc et al., 2004**).

2.7. Activité antioxydante d'*Artemisia campestris* :

Artemisia campestris a fait l'objet de plusieurs études portant sur l'exploration de son potentiel antioxydant (**Mohammedi, 2013**). L'étude d'**Aniya et al. (2000)** a montré que l'extrait d'*Artemisia campestris* du Japon est un puissant piégeur de radicaux libres composé de 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH), d'hydroxyle et de radicaux anion superoxyde vu que la partie aérienne de la plante est riche en composés aptes à l'activité antioxydante, tels que : les flavonoïdes, les polyphénols et les tanins (**Boudjouref, 2011**). Les tests réalisés par **Megdiche-Ksouri et al. (2014)** sur les extraits d'*Artemisia campestris* de la Tunisie ont montré que la capacité antioxydante totale était très élevée (540,56 mg GAE / g DR) par l'extrait méthanolique, suivie de l'extrait acétate éthylique (328,61 mg GAE / g DR) et puis l'extrait aqueux (216,11 mg GAE / g DR). Similairement a (**Akrout et al., 2010**) qui ont annoncé que l'extrait aqueux d'*Artemisia campestris* collecté du sud tunisien a une forte activité antioxydante déterminé par les méthodes DPPH = 2.053 (IC50 : mg/ml). Dans une étude comparative entre les méthodes d'extraction des extraits de la plante *Artemisia campestris* de la Bulgarie, **Karabegoviü et al. (2011)** ont constaté que l'interaction d'un antioxydant avec le DPPH dépend de la technique d'extraction et de l'espèce végétale.

Les effets antioxydants de l'huile essentielle extraite des feuilles d'*Artemisia campestris* du Maroc était supérieurs à 50% et le test du blanchiment au β -carotène avec l'acide linoléique s'est révélée une efficacité antioxydante maximale 82,2% et l'acide ascorbique standard 86,65% (**Dib et al., 2017**). Dans une étude comparative de l'activité antioxydante des huiles essentielles de deux échantillons d'*Artemisia campestris* de différentes régions d'Algérie, Laghouat et Djelfa, les tests de piégeage des radicaux libres du DPPH, la réduction du fer FRAP, le test de

blanchiment au β -carotène avec l'acide linoléique a révélé une activité antioxydante élevée pour les deux échantillons (**Boukhalkhal et al., 2018**).

3. Activité insecticide d'*Artemisia campestris* :

De nos jours, la recherche de pesticides botaniques suscite un grand intérêt, en raison de leurs effets toxiques mineurs sur l'environnement et les humains. À cet égard, de nouvelles recherches sur l'activité insecticide d'*Artemisia campestris* ont été entreprises. Il a été constaté que l'extrait méthanolique de sa tige présentait l'activité larvicide la plus élevée, avec 100% de mortalité de *Culex quinquefasciatus* (larves de moustiques) et la valeur estimée de la DL₅₀ était d'environ 23 parties par million (**Pavela, 2009**). Cependant, la durée de vie des insectes *Spodoptera littoralis* et *Bruchus obtectus* a été modérément réduite, en réponse au traitement à l'huile essentielle d'*Artemisia campestris*, avec une inhibition moyenne de 50% (**Akrout et al., 2007**).

4. Activité antidiabétique d'*Artemisia Campestris* :

Les effets d'extraits aqueux des feuilles d'*Artemisia Campestris* ont été examinés in vivo sur des rats diabétiques à une dose de 200 mg / kg de poids corporel qui a entraîné une réduction significative du niveau d'activité glycémie, des LDL, de la LPO, de la PCO et de l'AOPP dans le pancréas (**Sefi, 2010**).

5. Activité antitumorale d'*Artemisia campestris* :

L'huile essentielle et d'autres extraits d'*Artemisia campestris* collectés dans le sud de la Tunisie ont montré une activité cytotoxique contre les cellules HT-29 de cancer du côlon humain à l'aide d'activités de test au MTT allant de 19,5% pour l'huile essentielle à 64,4% pour l'extrait, ce qui signifie une inhibition de la croissance antitumorale (**Akrout, 2011**).

6. Activité antihypertensive d'*Artemisia campestris*:

Selon l'essai clinique mené de quelques volontaires adultes fumeurs et non-fumeurs, la pression diastolique et la fréquence cardiaque ont diminuée après 30 à 45 minutes dans les deux groupes après avoir la décoction de feuilles d'*Artemisia campestris* sans affecter la pression artérielle moyenne de ce dernier groupe non hypertendu. Le pourcentage d'hommes souffrant d'hypertension préalablement diagnostiquée dans le groupe des fumeurs a diminué de 50% à 33%, une heure après avoir pris l'extrait bouilli à l'eau. Bien que cela n'ait démontré qu'une

réponse immédiate, ce résultat a montré le potentiel de l'extrait d'*Artemisia campestris* pour compenser l'hypertension (**Ben-Nasr et al., 2014**).

Chapitre IV :
Mécanisme d'action des antimicrobiens

1. Généralités sur les agents antimicrobiens :

Les microorganismes présentent l'une des sources principales de pathologies humaines. Ce problème est contourné par les agents antimicrobiens qui peuvent être microbiocides ou bien microbiostatiques (Elkolly, 2017). Les antibactériens sont des différentes molécules d'origine biologique, hémisynthétique ou de synthèse. Leur utilisation pour la thérapie des infections bactériennes (antibiotiques) ou encore pour la désinfection des matériels et milieux inertes (antiseptiques et désinfectants) est directement reliée à leur toxicité plus ou moins sélective. (Allison, 2008).

1.1. Classification des principaux agents antimicrobiens :

Les agents antimicrobiens peuvent être classés en deux groupes, produits non létaux mais seulement inhibiteurs de croissance (Crémieux et Freney, 1995), et produits potentiellement létaux qui se divise en deux catégories :

- Composés chimiquement très réactifs à action non spécifique, les halogénés, les acides et bases fortes, les aldéhydes, se caractérisant par une action brutale, rapide et temporaire.
- Composés chimiquement stables à action plus spécifique, ce groupe comprend les dérivés phénoliques (Allion, 2008).

1.2. Choix de l'agent antimicrobien :

Pour assurer une bonne action, le principe actif doit répondre aux exigences suivantes :

- Large spectre d'activité et action durable,
- Efficacité en présence de résidus de souillure,
- Utilisation possible dans des conditions très différentes de pH et de dureté de l'eau,
- Action non corrosive sur les supports,
- Actif à faible concentration, ne présenter aucun danger aux concentrations d'utilisation et pour le métabolisme humain (Allion, 2008).

2. Mécanisme d'action des agents antimicrobiens :

Quelle que soit l'entité microbienne considérée et la molécule antimicrobienne utilisée, l'action des antimicrobiens peut se caractériser par les trois phases suivantes :

1. Adsorption à la surface de l'enveloppe microbienne, phénomène de nature physico-chimique dépendant notamment de la concentration et du mouvement brownien des bactéries (**Pieto et Bardoneschi, 1988**) ;
2. Pénétration de l'agent antimicrobien dans la cellule. La solubilité, l'ionisation et l'encombrement stérique des molécules antibactériennes sont des facteurs clé de cette phase (**McDonnell et Russell, 1999**) ;
3. Action proprement dite du principe actif. Elle peut avoir lieu au niveau de différentes cibles cellulaires possibles, telle que la membrane cytoplasmique dont l'altération de structure provoque une désorganisation du métabolisme, une fuite de substances, et la dégénérescence de la cellule et finalement sa mort ; ou encore le cytoplasme et plus précisément les protéines cytoplasmiques, les acides nucléiques ou les ribosomes (**Hugo, 1992**).

Ainsi, pour être actif, l'agent antibactérien doit pouvoir s'adsorber sur l'enveloppe microbienne et la traverser. Ces phénomènes sont donc fortement dépendants d'une part de la composition de la paroi bactérienne et d'autre part de la structure de la molécule de l'agent antibactérien (**Joly, 1995**).

2.1. Mécanismes d'action des antimicrobiens d'origine végétale :

De nombreux autres inhibiteurs de l'activité microbienne, isolés de plantes, ces agents antimicrobiens agissent de différentes façons sur les bactéries, les champignons et les virus soit sur la paroi ou et la synthèse protéique [(**Gibbons, 2008**) ; (**Hemaiswarya et al., 2008**) ; (**Stravri et al., 2007**)]

- **Les quinones** : leurs principales cibles sont les adhésines, les polypeptides et les enzymes membranaires (**Tan et Berridge, 2008**).
- **Les flavonoïdes** : leur activité est probablement due à leur capacité de se complexer aux protéines extracellulaires et solubles. Mais, les flavonoïdes à caractère lipophile peuvent détruire les membranes microbiennes en augmentant la fluidité des lipides membranaires (**Schroeter et al., 2002**).
- **L'Epigallocatechine** : gallate prévient l'infection par le virus de l'influenza en se liant à l'hémagglutinine virale, empêchant ainsi la fixation de particules virales au récepteur cible de la cellule et des modifications des propriétés de la membrane. Active contre l'adénovirus et les infections à entérovirus [(**Benn et al., 1996**) ; (**Dong et al., 1997**)].

- **Les ellagitannins** : sont actifs sur le VIH et ont des effets inhibiteurs sur la réplication du virus de l'Herpès simplex ainsi que le virus d'Epstein-Barr, cette activité est due à un effet inhibiteur sur la réplication du HSV y compris les souches résistantes à l'acyclovir, avec l'acyclovir (**Jourdes, 2004**).
- **Les tannins** : activité toxique contre les champignons filamenteux, les levures, les bactéries et les dermatophytes (*Microsporum* sp., *Trichophyton* sp). L'activité est due à leur capacité à se complexer aux protéines de transport. Ils sont, également, actifs sur le virus de l'influenza, l'Herpès simplex et l'Epstein-Barr virus [(**Haslam, 1996**) ; (**Scalbert, 1991**)]
- **Les coumarines** : la Warfarine possède des propriétés antivirales (**Cowman, 1999**).
- **Alcaloïdes antimicrobiens (La Berbérine)** : est potentiellement actif contre les trypanosomes et les plasmodiums. Le mécanisme d'action des alcaloïdes est attribué à leur capacité à s'insérer avec l'ADN (**Djoudi, 2012**). L'activité antivirale des alcaloïdes repose sur l'inhibition de la réplication par le blocage de l'activité de l'ADN-polymérase du virus. La Lycorine et la Hippéastine agissent sur la multiplication virale ; c'est à dire la synthèse d'ADN viral résultant d'une diminution de l'activité de l'ADN polymérase (**Amin et al., 1969**).

2.2. Mode d'action des huiles essentielles :

Les huiles essentielles ont un spectre d'inhibition très étendu car elles agissent contre un large éventail de bactéries comprenant des bactéries à Gram positif et à Gram négatif (**Remmal et al., 1993**), y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques. Cette activité est par ailleurs variable d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre (**Kalembe et Kunicka, 2003**). Des champignons [(**Maudsley et Kerr, 1999**) ; (**Pattnaik et al., 1997**) ; (**Valnet et al., 1978**)], aussi bien que des virus à ADN et à ARN (**Siddiqui et al., 1996**).

Le mode d'action des huiles essentielles sur les cellules bactériennes n'est pas clairement élucidé (**Kalembe et Kunicka, 2003**). Ce compte-tenu de la diversité des molécules présentées dans les huiles, l'activité antibactérienne semble résulter d'une combinaison de plusieurs modes d'action, impliquant différentes cibles cellulaires (**Arabi, 2018**). Plusieurs études montrent que les molécules phénoliques telles que le xylénol, le crésol et le carvacrol exercent une activité bactéricide en provoquant des altérations des membranes bactériennes et la perte des métabolites intracellulaires (**Ghayour, 2002**). Cette activité est due à la principale

caractéristique des molécules présentes dans les huiles essentielles est leur hydrophobicité qu'elle permet leur solubilisation dans les membranes, ce qui provoque une déstabilisation de la structure et une augmentation de la perméabilité membranaire (**Sikkema et al., 1994**). Ces modifications entraînent une fuite d'ions et de composés intracellulaires (**Carson et al., 2002**), Si la perte de matériel est trop importante ou si les éléments cytoplasmiques relargués sont indispensables à la survie de la bactérie, cela entraîne la mort cellulaire (**Ultee et al., 2002**).

Le **tableau (06)** résume les différents modes d'action de quelques molécules antibactériennes issue des huiles essentielles.

Tableau 06 : différents mode d'action de quelques molécules antibactériennes issue des huiles essentielles

Molécule antimicrobienne	Souches utilisées	Cibles	Mode d'action de la molécule	Références
Terpinène-4-ol	<i>Staphylococcus aureus</i>	Membrane plasmique	<ul style="list-style-type: none"> - Capable de perméabiliser les membranes plasmiques, entraînant une perte d'ions potassium. - Cause une perte de matériel cytoplasmique et la formation de structures ressemblant à des mésosomes. 	[(Christine et al., 2002) ; (Cox et al., 2000)]
Carvacrol	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i>	Membrane plasmique, ATP intracellulaire,	<ul style="list-style-type: none"> - Pénètre dans la bicouche lipidique et se positionne entre les chaînes d'acides gras et augmente la fluidité membranaire, aboutissant à une modification de la perméabilité. Il forme des canaux dans la membrane permettant la fuite des ions, cette déformation de la structure augmente la fluidité membranaire, aboutissant à une modification de la perméabilité passive. - Diminuer l'ATP intracellulaire, mais aussi une diminution du potentiel membranaire, en augmentant la perméabilité de la membrane plasmique, n'entraîne pas une fuite d'ATP mais une fuite de protons, qui provoque la chute de la force protomotrice et, donc, de la synthèse d'ATP. - Capable d'inhiber la production de toxines chez <i>Bacillus cereus</i>. 	[(Ultee et al., 1998) ; (Ultee et al., 2000) ; (Ultee et Smid, 2001) ; (Ultee et al., 2002)]
Thymol	<i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>	Membrane plasmique	<ul style="list-style-type: none"> - Provoque des altérations de la paroi bactérienne et des agrégations du cytoplasme. - Capables d'augmenter la perméabilité membranaire en détruisant la membrane externe des bactéries Gram négatives, ils augmenteraient la perméabilité de la membrane plasmique aux métabolites cellulaires. 	[(Bennis et al., 2004) ; (Cox et al., 2000) ; (Helander et al., 1998) ; (Lambert et al., 2001) ;

			<ul style="list-style-type: none"> - Altérer sa perméabilité et entraîne une perte du matériel intracellulaire. De plus, après avoir traversé la membrane, il peut interagir avec des sites intracellulaires. - Entraîne une diminution de la taille des bactéries, moyen probablement employé pour survivre une agrégation du cytoplasme 	(Rhayour et al., 2003) ; (Walsh et al., 2003)]
cinnamaldéhyde	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Enterobacter sp</i> , <i>Micrococcus</i>	ATP synthétases	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibe les ATP synthétases bactériennes et provoque une diminution de la production d'ATP intracellulaire - Entraîne aussi une forte diminution de la densité cellulaire. 	[(Gill et Holley, 2004 et 2006) ; (Kwon et al., 2003)]
Eugénol	<i>Bacillus cereus</i>	ATP synthétases membranaires	<ul style="list-style-type: none"> - Provoque une dégradation de la paroi cellulaire entraînant une inhibition de l'activité des ATP synthétases membranaires ; - Une concentration sublétales d'eugénol entraîne une inhibition de la production d'amylases et de protéases chez <i>Bacillus cereus</i> 	[Gill et Holley, 2006) ; (Thoroski et al., 1999)]

Les modes d'action des huiles essentielles et de leurs principaux constituants, décrits jusqu'à présent, semblent tous affecter la paroi ou la membrane cytoplasmique. Cependant, la variabilité chimique des huiles essentielles laisse présager l'existence de molécules pouvant agir par de nouveaux mécanismes cellulaires (**Guinoiseau, 2011**).

Les huiles essentielles présentent une très grande richesse de molécules, tant en nombre qu'en variété. Leur criblage permettrait de découvrir de nouveaux antibactériens, qui pourraient constituer une alternative à l'usage des antibiotiques conventionnels devenus inefficaces [(**Falconner et Brown, 2009**) ; (**Schmidt, 2004**) ; (**Tan et Darren, 2000**)].

Partie expérimentale

Matériel et méthodes

Ce travail a été effectué au laboratoire de Biotoxicologie, Pharmacognosie et Valorisation Biologiques des Plantes (LBPVBP) et le laboratoire pédagogique au département de biologie à la faculté des sciences de l'université Dr. Moulay Tahar de Saida. L'extraction de l'huile essentielle a été effectuée au laboratoire pédagogique de l'université de Mostaganem.

1. Matériel :

1.1. Matériel végétal :

La récolte de la plante étudiée (*Artemisia campestris*) a été réalisée dans la région d'Ain El Hdjar (Wilaya de Saida) (**Figure 02**), qu'est située à 4 km du chef-lieu de la wilaya de Saïda (**Tableau 07**).

Tableau 07 : Géographie de la région (DB city, 2019)

Latitude	34.7587
Longitude	0.144367
Coordonnées géographiques	34° 45' 31" Nord, 0° 8' 40" Est
Altitude	1 014 m
Climat	Climat semi-aride sec et froid (Classification de Köppen : BSk)

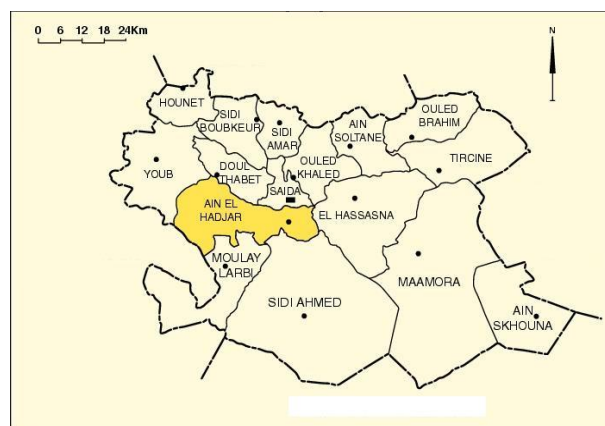


Figure 02 : carte géographique représente la zone de la récolte (Labani et al., 2006)

La plante étudiée *Artemisia campestris* a été récoltée durant les mois de novembre et décembre de l'année 2018. La plante est séchée à l'ombre dans un endroit sec et à température ambiante et aéré pendant un mois (**Figure 03**). Après le séchage, la plante est finement broyée puis stockée dans des bocaux en verre jusqu'à l'utilisation.



Figure 03 : séchage de la plante *Artemisia campestris*

1.2. Matériel biologique :

1.2.1. Microorganismes :

Les souches bactériennes et les levures utilisées dans cette étude ont été gracieusement fournies par le Laboratoire antibiotiques, antifongiques, Département de Biologie ; Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Tlemcen. Cependant, les espèces fongiques ont été fournies par M. Adli Djllal Eddine, maître de conférences au département de biologie de l'université Dr. Moulay Tahar de Saida.

Six souches de bactéries (06) et sept espèces fongiques (07) : trois (03) levures et quatre (04) champignons ont fait l'objet de cette étude (**Tableau 08**).

1.2.2. Globule rouge :

Les tests de la cytotoxicité des extraits et de l'huile essentielle *d'Artemisia campestris* ont été effectués sur les globules rouges du sang humains provenant d'un donneur unique sain d'un groupage (A+).

Tableau 08: Souches utilisées pour évaluer l'activité antimicrobienne

	Nom de la souche	Références	Définition	Références
Bactéries	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Cocci, Gram positif, immobiles, aéro anaérobies facultatives, catalase positive, oxydase négative.	(Kayser <i>et al.</i> , 2005)
	<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115	Bacille à gram positif, non sporulé, non capsulé, catalase positive, oxydase négative.	[(Moura <i>et al.</i> , 2016) ; (Daryl et Pascale, 2017)]
	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778	Bacilles à gram positif, sporulées, aéro anaérobies facultatives, mobiles, catalase positive, oxydase négative.	[(Drobniewski, 1993) ; (Ivanona <i>et al.</i> , 2003)]
	<i>Salmonella Typhimurium</i>	ATCC 13311	Bacilles à Gram négatif, aéro anaérobies facultatives, non sporulés, mobiles à ciliature péritriche, oxydase négatif.	(Nairz <i>et al.</i> , 2007)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Bacille, Gram négatif, mobile, grâce à un flagelle polaire. C'est une bactérie aérobie stricte, oxydase positif	(Irving <i>et al.</i> , 2005)
	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Coccobacille, Gram négatif et mobile (ciliature péritriche), catalase positives, oxydase négative	[(Kayser <i>et al.</i> , 2005) ; (Irving <i>et al.</i> , 2005)]
Levure	<i>Candida albicans</i>	ATCC	26790	(Richard et William, 2001)
	<i>Candida albicans</i>		IP444	
	<i>Candida albicans</i>		10231	
Moisissures	<i>Penicillium spp</i>	Isolée	Mycètes mésophiles, caractérisé par la présence d'éléments mycéliens plus ou moins complets	(centre de références en santé publique, 2019)
	<i>Aspergillus niger</i>	Isolée	Champignon filamenteux, largement utilisé en production pharmaceutiques et d'enzyme industrielles.	(Herman <i>et al.</i> , 2007)
	<i>Phytophthora infestant</i>	Isolée	Oomycète d'une forme duveteuse, à colonies compactes, destructeur dans les régions au climat humide.	(Blancard, 2017)
	<i>Endosporium spp</i>	Isolée	Colonies noires à croissance lente, texture épaisse avec longue filament mycélien.	(Tsuneda <i>et al.</i> , 2008)

2. Méthodes :

Notre travail s'inscrit dans le cadre de la contribution à une meilleure connaissance relative aux activités biologiques et à la composition chimique de la plante *Artemisia campestris*. Dans ce contexte, notre démarche expérimentale est résumée à travers le schéma suivant **Figure (04)** :

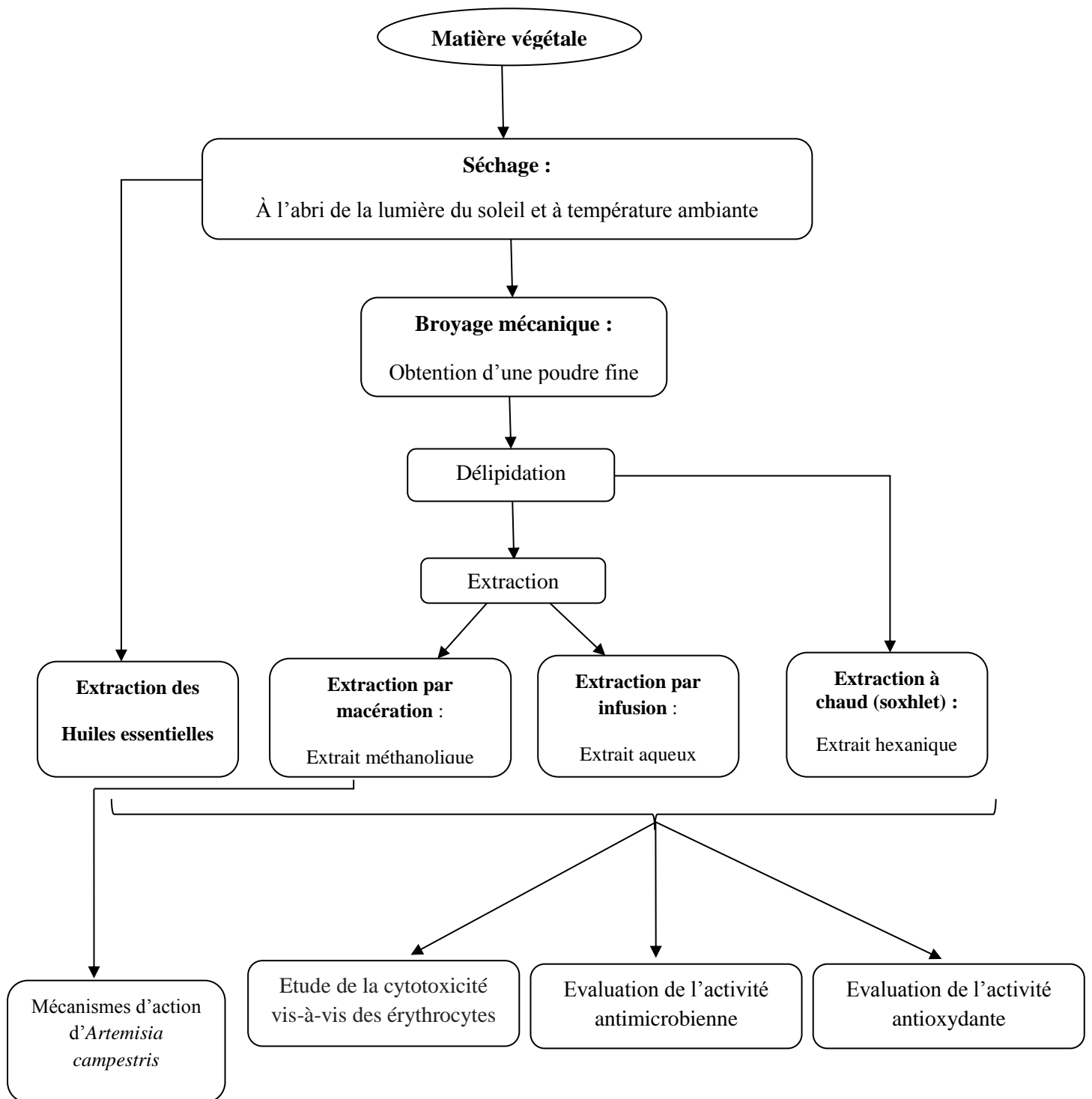


Figure 04 : Schéma illustrant la démarche expérimentale suivie dans cette étude

2.1. Préparation des extraits

L'extraction veut dire la séparation des parties actives de tissus végétaux des composants actifs ou inertes et les retirer à l'aide de l'eau ou des solvants sélectifs ont des polarités différentes. Les produits obtenus sont relativement sous forme de liquides, semi-solides ou poudres exclusivement destinées à un usage oral ou externe. Il s'agit de préparations connues comme les tisanes et les huiles médicinales (**Handa, 2008**).

Dans notre étude, l'extraction est effectuée par l'utilisation d'un solvant organique polaire, le méthanol, par la méthode de macération ; par l'eau distillée pour la méthode d'infusion, afin d'avoir des principes actifs de notre plante. Cependant, l'extraction des huiles essentielles a été réalisée par l'entraînement à la vapeur. Une délipidation a été effectuée préalablement pour éliminer les lipides et qu'est considérée comme extraction par un solvant apolaire, l'hexane.

2.1.1. Délipidation :

Avant d'entamer l'extraction proprement dite, nous avons procédé à une délipidation du matériel végétal par soxhlet dans l'hexane. Cette méthode a été retenue comme technique d'extraction car elle favorise une extraction relativement complète des métabolites présents dans la matrice végétale, cette étape préliminaire a pour but d'éliminer les lipides et les pigments (**Bouchouka, 2016**). Le protocole suivie pour cette étape est celui de Haddoudi, (2014).

20 g de la plante *Artemisia campestris* sont disposés dans une cartouche cellulosique poreuse, puis introduite dans l'extracteur du soxhlet. 260 ml de l'hexane est mis en ébullition à température de 68°C dans un ballon monocole relié au pied de l'extracteur. Les vapeurs dégagées passent par une tubulure menant au réfrigérant pour y être condensées. Le condensat tombe par gravité dans le réservoir contenant la cartouche et solubilise les molécules actives. Une fois plein, le mélange solvant-extrait est siphonné vers le ballon ce qui permet de régénérer le solvant et de recommencer un autre cycle (**Figure 05**). La durée d'extraction est variée entre 20 à 30 minutes, celui-ci est mesuré à partir du moment de l'ébullition du solvant. Après le troisième cycle le mélange solvant-extrait est filtré puis distillé à l'évaporateur rotatif à une température de 68°C, ensuite séché à l'étuve pour avoir un extrait complètement évaporer du solvant et conservé au 4°C, tandis que la matière végétale est séchée à l'étuve pendant quelques minutes en suite conservée dans des bocaux en verre jusqu'à l'utilisation.

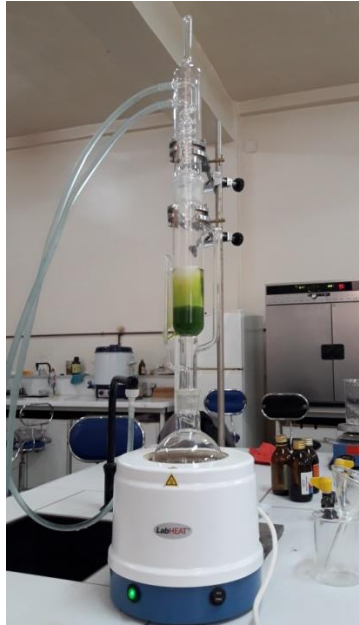


Figure 05: procédure de la délipidation d'*Artemisia campestris*

2.1.2. Extraction par macération :

La macération est la méthode d'extraction solide-liquide la plus simple. Elle consiste en la mise en contact du matériel végétal avec le solvant sans ou avec agitation, L'opération bien que généralement longue et a rendement souvent médiocre, et utilisée dans le cas d'extraction de molécules thermosensibles (**Leybros et Fremeaux, 1990**).

Une quantité de 80g de la matière végétale broyée d'*Artemisia campestris* délipidée est macérée dans 600ml de méthanol pendant 24 heures, à froid, à l'ombre et sous agitation (**Figure 06**). Le filtrat méthanolique obtenu est filtré sur papier filtre (**Figure 07**), puis concentré sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif à 65°C (**Figure 08**), L'extrait obtenu a été conservé au 4°C jusqu'à l'utilisation (**Bouchouka, 2016**).



Figure 06 : Extraction d'*Artemisia campestris* par la macération



Figure 07 : Filtration de l'extract après 24h de macération



Figure 08 : Evaporation sous vide de l'extract méthanolique

Les étapes suivies pour l'extraction des molécules actives d'*Artemisia campestris* est illustrée en (Figure 09).

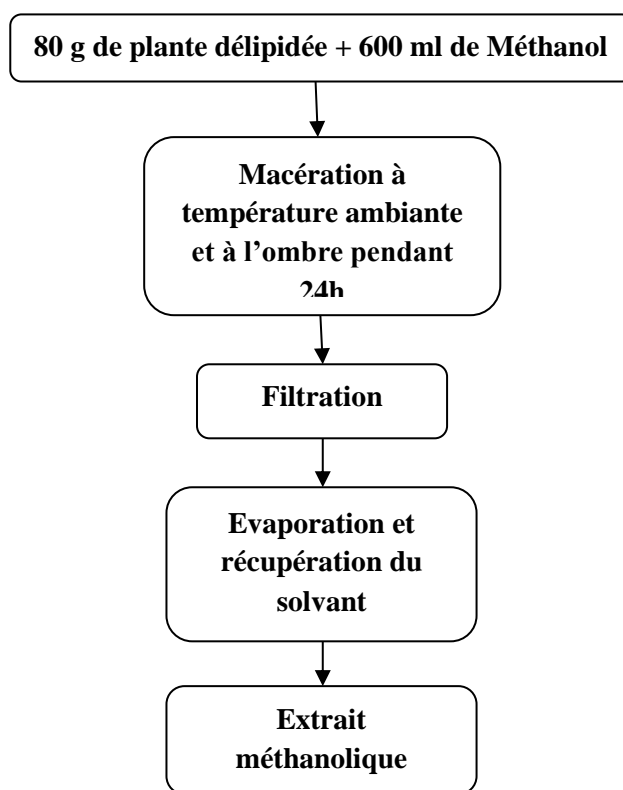


Figure 09 : Schéma illustrant l'extraction par macération.

2.1.3. Extraction par infusion :

Une quantité totale de 20g de la partie aérienne d'*Artemisia campestris* séchée, broyée et délipidée est infusée pendant 30 minutes dans 100 ml l'eau distillée bouillie (Dib, 2010) (Figure 10). Ensuite, l'extrait brut est filtré, évaporé sous vide à une température de 100°C jusqu'à séchage complet et stocké à 4°C (Figure 11).

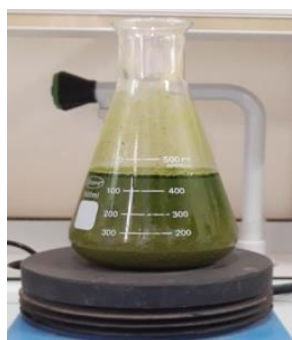


Figure 10: Extraction par la méthode d'infusion



Figure 11: concentration de l'extrait

La procédure de l'extraction par infusion est schématisée dans la **Figure 12**.

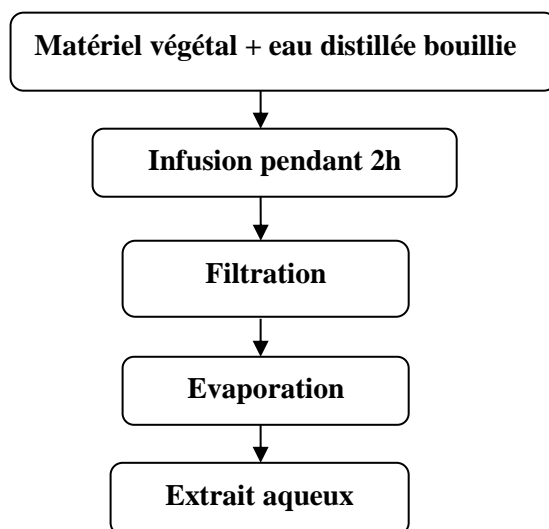


Figure 12: Schéma illustrant l'extraction par infusion

Le rendement en pourcentage (%), est défini comme étant le rapport entre la masse d'extrait et celle de la plante sèche en poudre (**Bouchouka, 2016**), Il est calculé par la formule suivante:

$$\text{Rdt}\% = \frac{P1 - P2}{P3} \times 100$$

P1 : poids du ballon après l'évaporation

P2 : poids du ballon vide

P3 : poids de la matière végétale sèche de départ

2.1.4. Extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles a été effectuée par l'entraînement à la vapeur d'eau (**Figure 013**). Une quantité de 320g de la partie aérienne d'*Artemisia campestris* séchée et située au-dessus d'une grille de l'autocuiseur et subit une vapeur d'eau bouillante fournie par une chaudière pendant 2h, ce qui provoque un éclatement cellulaire qui va libérer alors les espèces chimiques odorantes (non solubles dans l'eau) qui se condensent dans le réfrigérant refroidi par l'eau du robinet, puis sont récupérées dans une éprouvette graduée (**El haib, 2011**). L'huile essentielle obtenue par la suite est stockée dans un tube en verre à fond plat à l'abri de la lumière, à une température de 4°C jusqu'à l'utilisation (**Gardeli et al., 2008**).

Le rendement de l'huile a été calculé selon l'équation ci-dessous (**Kusuma et Mahfud, 2017**) :

$$Y = (v/w) \times 100$$

y : Le rendement en huile essentielle (% , p/p)

V : Le poids de l'huile extraite (g)

W : Le poids des parties végétales fraîches (g)



Figure 13 : extraction des huiles essentielles d'*Artemisia campestris* par l'entraînement à la vapeur d'eau

2.2. Tests phytochimique :

2.2.1. Les alcaloïdes :

Les tests sont réalisés par des réactions de précipitation avec les réactifs de Mayer, de Wagner et Dragendorff. 3 ml de chaque extrait sont évaporés à sec, le résidu est repris par 2 ml d'HCl 2N. Dans trois tubes à essai contenant 1 ml du filtrat, nous avons ajouté 5 gouttes de réactif de Mayer dans le premier tube, 5 gouttes du réactif de Wagner dans le second tube et 5 gouttes du réactif de Dragendorff dans le troisième tube.

- L'apparition d'un précipité blanc, brun et orange, respectivement, révèle la présence d'alcaloïdes.
- **Réactif de Dragendorff** : (Tétraiodobismuthate de potassium) ou appelle aussi réactif à l'iodobismuthate de potassium : Solution A : Dissolve 0.5g de bismuth nitrate ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) dans 20 ml d'acide acétique 20% ; Solution B : 5ml de KI préparée à 40% dans l'eau distillé ; Mélanger A et B et Ajuster à 100ml par l'eau distillé.
- **Réactif de Mayer** : Solution A : 1.358g de chlorure de mercure HgCl_2 sont dissous dans 60 ml d'eau distillée ; Solution B : 5g d'iodure de potassium KI sont dissous dans 10ml d'eau distillée ; Les solutions A et B sont mélangées extemporanément et le volume final est ajusté à 100ml avec d'eau distillée.
- **Réactif de Wagner** : 2g de KI et 1,27g de I sont dissous dans 75ml d'eau distillée, puis ajustés à 100ml avec d'eau distillée (**Karumi et al., 2004**).

2.2.2. Tanins

Dans un tube à essai, introduire 0,5 ml d'extrait à analyser, ajouter 1 ml d'eau et 1 à 2 gouttes de solution aqueuse de FeCl_3 diluée à 1%. En présence de tanins, il se développe une coloration verdâtre ou bleu-noirâtre.

- L'apparition d'une coloration vert foncé ou bleu-verte indique la présence des tanins.
- L'apparition d'une coloration vert foncé indique la présence des tanins catéchiques.
- L'apparition de la coloration bleu-verte indique la présence des tanins galliques (**Karumi et al., 2004**).

2.2.3. Flavonoïdes :

A 0,5 ml d'extrait à tester, ajouter, 1 ml d'alcool iso amylique, quelques copeaux de magnésium et quelques gouttes d'acides chlorhydrique (HCl). L'apparition d'une coloration rose ou rouge indique la présence des flavonoïdes (**Karumi et al., 2004**).

2.2.4. Anthocyanes :

A 0,5 ml de l'extrait, nous avons ajouté 2,5 ml d'acide sulfurique (H_2SO_4) à 10% puis de l'hydroxyde d'ammonium (NH_4OH) à 25%. Si la coloration s'accroît par acidification, puis vire au bleu-violet en milieu basique, cela permet de conclure la présence des anthocyanes (**Karumi et al., 2004**).

2.2.5. Quinones

Les substances quinoniques sont recherchées par le réactif de Bornstraëgen. 0,5 ml de chaque extrait est évaporé à sec. Le résidu est trituré dans 2,5 ml d'acide chlorhydrique 37% au 1/5. Le triturât est versé dans un tube à essai et porté ensuite au bain-marie pendant 30 min. Après refroidissement, il est extrait par 20 ml de chloroforme. L'ammoniaque diluée 2 fois (0,5 ml) est ajouté à la solution chloroformique. L'apparition d'une coloration rouge ou violette confirme la présence de quinones (**Oloyede, 2005**).

2.2.6. Saponines : Indice de mousse

Dans une série de 10 tubes à essai numérotés de 1 à 10, introduire respectivement 1, 2, 3, ..., 10 ml de la solution à analyser. Ajuster le volume de chaque tube à 10 ml avec de l'eau distillée. Agiter chaque tube dans le sens de la longueur du tube pendant 15 secondes à raison de 2 agitations par seconde. Laisser reposer 15 min et mesurer la hauteur de la mousse produite dans chaque tube (**Oloyede, 2005**). L'indice de mousse (I) est calculée par la formule suivante :

$$I = 1000 / N$$

– N : est le numéro du tube où la hauteur de mousse est égale à 1 cm.

2.2.7. Coumarines (Fluorescence UV)

0,5 ml de chaque extrait est évaporé à sec. Le résidu ainsi obtenu est repris dans l'eau chaude. Un volume de cette phase aqueuse est additionné d'une solution d'ammoniaque (NH₄OH) à 10% et un autre volume est gardé comme témoin. L'apparition de fluorescence après observation sous UV à 366 nm indique la présence de coumarines (**Bruneton, 1999**).

2.2.8. Stérols et triterpènes : La réaction de Liebermann Buchard.

Evaporer à sec 5 ml de la solution à analyser, dissoudre le résidu dans 1 ml d'anhydride acétique puis 1 ml de chloroforme. A l'aide d'une pipette ajouter 1 ml de H₂SO₄ concentré au fond du tube sans agiter. Laisser reposer 30 minutes. La formation d'un anneau rouge brunâtre à la zone de contact des deux liquides et une coloration violette de la couche surnageante révèlent la présence de stérols et triterpènes (**Bruneton, 1999**) :

2.2.9. Composés réducteurs

Introduire 1 ml d'extrait dans un tube, ajouter 1 ml de liqueur de Fehling (0,5ml réactif A et 0,5ml réactif B) et incuber l'ensemble 8 min dans un bain marie bouillant. L'apparition d'un précipité rouge brique indique la présence des composés réducteurs (**Trease et Evans, 1987**).

2.3. Evaluation de l'activité antioxydante:

2.3.1. Capacité antioxydante totale :

Ce test est basé sur la réduction du molybdène (Mo^{6+}) en molybdène (Mo^{5+}) par l'extrait de plante. Cette réduction induit, à pH acide, la formation du complexe phosphate/ Mo^{5+} de couleur verte (**Prieto et al., 1999**). Une prise de 1 ml d'extrait convenablement dilué est combinée dans un tube avec 3 ml de solution composée d'acide sulfurique (0.6 N), de phosphate de sodium (Na_3PO_4 , 28 mM) et de molybdate d'ammonium ($(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 4 mM). Les tubes sont incubés à 95°C pendant 90 mn. Après un repos de 6 minutes à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 695 nm contre un blanc contenant du méthanol à la place de l'extrait. Comme pour les polyphénols totaux, l'activité antioxydante totale est exprimée en mg d'équivalent acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG.g⁻¹ MS).

2.3.2. Test d'activité anti-radicalaire (DPPH) :

La molécule de 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH[·]) est un radical libre stable, dont la solution possède une coloration violette et une absorption caractéristique à 517 nm. Quand une solution de DPPH[·] est mélangée avec une substance donneuse d'atomes d'hydrogène, antioxydante, il y'a formation de la forme réduite (**Figure 14**). Ceci provoque la perte de la coloration violette en coloration jaune caractérisée par une bande d'absorption dans le visible à 517 nm (**Brand-Williams, 1995**).

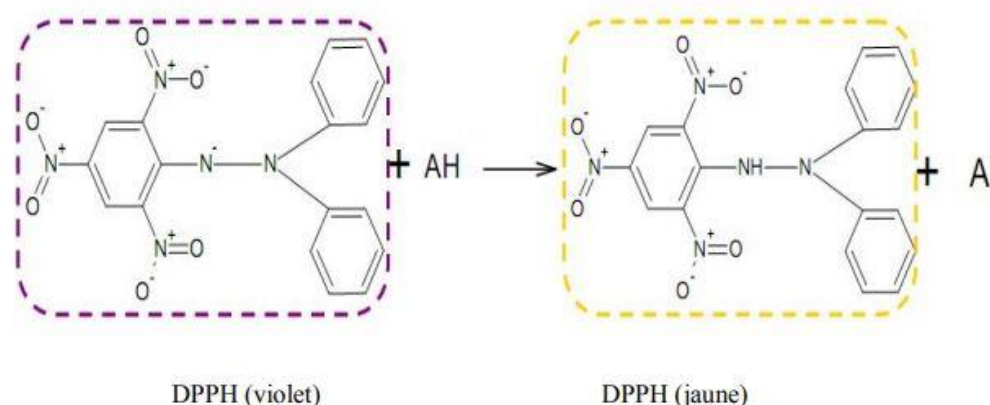


Figure 14 : structure chimique du radical DPPH et sa forme réduite (**Brand-Williams, 1995**)

Les extraits secs sont repris, dans quelques millilitres de méthanol pour les dosages et les évaluations de l'activité antioxydante. Pour la mesure de l'activité, une prise d'essai de 1 ml d'extrait à différentes concentrations est mise en présence de 250 µl d'une solution de DPPH (0.2 mM, préparée dans le méthanol). Le mélange est placé pendant 30 mn à l'obscurité pour réagir et l'absorbance est mesurée à 517 nm contre un témoin négatif (sans extrait). L'antioxydant de synthèse utilisé est l'acide ascorbique (**Bouchouka, 2016**). Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition, calculés suite à la diminution de l'intensité de la coloration du mélange, selon la formule :

$$PI = (DO \text{ témoin} - DO \text{ extrait} / DO \text{ témoin}) \times 100$$

- PI : pourcentage d'inhibition
- D.O témoin : absorbance du témoin négatif
- D.O extrait : absorbance de l'extrait

Notons que compte tenu de la solubilité en milieu organique du DPPH, cette méthode est plus adaptée pour les dosages qui se déroulent en milieu alcoolique (méthanol et éthanol). L'étude de la variation de l'activité antiradicalaire en fonction de la concentration des extraits permet de déterminer la concentration qui correspond à 50% d'inhibition (IC_{50}). Une faible valeur d' IC_{50} correspondant à une grande efficacité de l'extrait (**Beddou, 2015**).

2.4. Evaluation de l'activité antimicrobienne

Le test d'évaluation de l'activité antimicrobienne des différents extraits a été déterminé par différentes méthodes représentées dans la **Figure 15**.

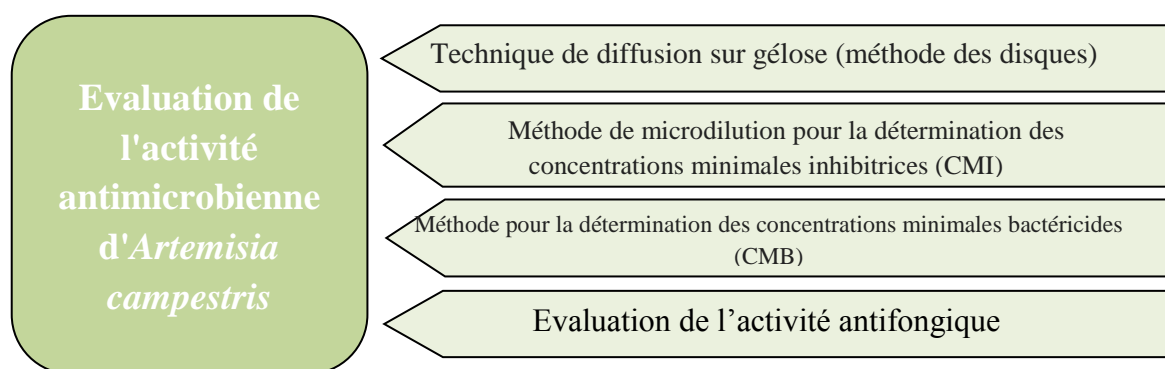


Figure 15 : schéma illustrant les différentes méthodes pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne

2.4.1. Activité antifongique

Nous avons effectué le test antifongique selon la technique de **Hassane et al (2012)** avec une légère modification qui consiste en l'obtention d'une répartition homogène d'extrait dans le milieu de culture et d'assurer un contact maximum entre le mycélium fongique et les substances contenues dans l'extrait sur quatre espèces de champignons. Les dilutions d'extrait choisies sont de 01µl, 02.5µl, 05µl, 07.5µl et 10µl. Une prise d'extrait à différentes concentrations est mise 20ml de PDA acidifiée et coulée dans des boîtes. Après la solidification, les boîtes sont incubées pendant 03 à 05 jours à 28°C avec un disque de mycélium de 06mm de diamètre placé aseptiquement dans le centre de la boîte qui a été prélevé auparavant du centre d'un mycélium jeune et précultivé. Cependant, les boîtes de témoin sont incubées sans l'addition de l'extrait (**Gilbert et Wood, 2006**).

L'inhibition est estimée, pour chaque espèce de champignons, par la détermination du taux de d'inhibition (I%).

$$I (\%) = 100 \times (dC - dE) / dC$$

I(%) = Taux d'inhibition exprimé en pourcentage.

dC = Diamètre de colonies dans les boîtes « témoins positifs ».

dE = Diamètre de colonies dans les boîtes contenant l'extrait.

2.4.2. Technique de diffusion sur gélose (méthode des disques)

Cette méthode consiste à tester la sensibilité (évaluation qualitative) des microorganismes vis-à-vis des substances antimicrobiennes. Elle a été proposée et standardisée en 2004 par Clinical and Laboratory Standards Institute (**CLSI-M44-A, 2004**).

Elle permet de déterminer l'activité inhibitrice de croissance bactérienne par la mesure du diamètre d'inhibition autour d'un disque (**Shariffar et al., 2007**). Les souches ont été utilisées pour déterminer l'activité antimicrobienne sont entretenues par repiquages successifs sur Gélose Nutritive (Bactéries) et sur Gélose Sabouraud (Levures) et conservées à 4°C dans des tubes stériles contenant 10 ml de milieu de culture incliné. Avant d'évaluer l'activité antimicrobienne, nous avons vérifié les souches de référence utilisées par des tests préliminaires d'identification.

a. Identification des bactéries :

Examen macroscopique : L'examen macroscopique consiste à étudier l'aspect des colonies. Une colonie est l'amas, visible à l'œil nu, constitué par des milliards de descendants d'une seule cellule bactérienne et dont la taille, la forme, la couleur, la consistance parfois caractéristiques de chaque espèce. L'étude de l'aspect des colonies nécessite une observation à l'œil nu, en lumière naturelle ou artificielle (**Arabi, 2018**).

Examen microscopique : L'observation microscopique, permet d'étudier l'aspect morphologique des cellules d'une espèce microbienne. Elle comprend l'examen à l'état frais (examen entre lame et lamelle des bactéries vivantes) et l'examen après coloration, le plus souvent sur frottis séchés et fixés (coloration de Gram), nous avons suivi la méthode de (**Cavallo, 2007**) pour réaliser ce test.

Coloration de Gram : La coloration de Gram est une technique qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne. Elle permet de colorer les bactéries et de distinguer leur aptitude à fixer le violet de gentiane (Gram+) ou la fuchsine (Gram-).

Une goutte d'eau distillée a été déposée sur une lame de microscope bien nettoyée à l'alcool, toucher une colonie à l'aide d'une anse de platine stérile pour prélever des bactéries. Il n'est pas nécessaire de prendre beaucoup de bactéries, puis frotter la pointe dans la goutte d'eau. Laisser sécher la lame près de la flamme en passant la lame trois fois dans la petite flamme (veilleuse) du bec Bunsen pour fixer l'échantillon à la chaleur.

Déposer quelques gouttes de solution de violet de gentiane (cristal violet) sur le frottis fixé et laisser agir une minute. Le violet de gentiane colore le cytoplasme des bactéries. Jeter l'excès de colorant dans un bécher et rincer brièvement en faisant couler de l'eau distillée sur la lame au-dessus du frottis (pas directement sur le frottis). Déposer quelques gouttes de Lugol sur le

frottis. Le Lugol (composé iodé) est un mordant qui permet de fixer le violet dans les bactéries. Laisser agir 1 minute et jeter la solution de Lugol dans un bécher et rincer brièvement à l'eau distillée comme précédemment décrit. Verser goutte à goutte de l'alcool sur la lame inclinée obliquement jusqu'à ce que le violet ne s'écoule plus du frottis (30 secondes à une minute). Si l'alcool pénètre dans la bactérie, la coloration au violet de Gentiane disparaît. Les bactéries donc sont de type Gram-, si l'alcool ne traverse pas la paroi, on est en présence de bactéries Gram+. Rincer à l'eau distillée. Contre-colorer en déposant la fuchsine pendant 1 minute. Ce colorant permet de visualiser les bactéries Gram- décolorées à l'étape précédente. Cette coloration moins forte que le violet n'affecte pas la couleur des Gram+. Rincer à l'eau distillée et sécher la lame à l'air ou entre 2 feuilles de papier buvard. Enfin, observer à l'objectif à immersion ($\times 100$) après dépôt d'une goutte de l'huile à immersion (Arabi, 2018).

b. Préparation des solutions mères :

Huiles essentielles : Nous avons préparé une solution mère (3ml) dans une éprouvette de 5ml à partir de 1ml (1000 μ l) des huiles essentielles d'*Artemisia campestris* et 0,5 ml Tween 80. Ce volume a été complété par le diméthylsulfoxyde DMSO jusqu'à 3ml (3000 μ l). Ensuite, nous avons homogénéisé la solution à l'aide d'un agitateur vortex et filtrée aseptiquement avec un filtre millipore stérile (Burt, 2004).

Extraits : Mêmes étapes de la préparation des huiles essentielles ont été suivies pour préparer les extraits, sauf que, la solution mère (3ml) a été préparée à partir de 1g de chaque extrait dilué en 2 ml de DMSO (diméthylsulfoxyde) à l'aide d'un agitateur vortex et filtrée aseptiquement avec un filtre millipore stérile. Les préparations ont été conservées aseptiquement jusqu'à l'utilisation (Burt, 2004).

c. Préparation de l'inoculum :

À partir d'une préculture jeune sur gélose nutritive pour les bactéries ou Sabouraud gélose pour les levures, nous avons prélevé quelques colonies bien isolées et morphologiquement identiques et nous avons les re-suspendu dans 5 ml de bouillon nutritif, et les agitées à l'aide d'un agitateur vortex pendant quelques secondes.

L'inoculum est ajusté à 10^8 cellules/ml (une DO de 0,08 à 0,1) par lecture de la densité optique avec un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 625 nm pour les bactéries et à 10^6 cellules/ml à longueur d'onde de 580 nm pour les levures (Tableau 09).

Tableau 09: Tableau informatif des conditions de la méthodes de diffusion pour les bactéries et les levures

	Bactéries	Levures
Milieu de la préculture	Gélose nutritive	Sabouraud gélose
La durée de la préculture	18h à 24h	48h
Température d'incubation	37°C	30°C
Nombre de colonies prélevées	5 colonies	2 colonies
Longueur d'onde	620 nm	580 nm

Ensuite, les boîtes de Pétri contenant de Mueller Hinton gélosé à pH de 7,2 à 7,4 sont ensemencées aseptiquement par écouvillonnage. Dans la suite, elles sont séchées à proximité de la flamme (15 min).

d. Dépôt des disques :

Des disques de 6 mm de diamètre préparés à base de papier filtre (Whatman No.1), et stérilisés par autoclavage sont imbibés de 10 µl de chaque extrait à tester puis placés sur le milieu Mueller Hinton gélosé préalablement ensemencé avec la souche à tester [(Abirami et Venugopal, 2005) ; (Nejjah *et al.*, 2006)]. Les boîtes sont laissées pendant 15 minutes à la température ambiante avant d'être mises à incuber dans une étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures (bactéries) ou 35°C pendant 20 à 24 heures (levures). Après l'incubation, une zone ou un halo clair apparait autour du disque (**Figure 17**).

La lecture des résultats est faite par mesure des diamètres des zones d'inhibitions en (mm). Les zones doivent être uniformément circulaires (**Espinel-Ingroff et Canton, 2007**).

Selon **Barros et al. (2007)**, l'activité antimicrobienne est exprimée en zones d'inhibition comme suit :

- Diamètres inférieurs à 7 mm : aucune activité antimicrobienne (-)
- Diamètres de 7 à 9,9 mm : activité antimicrobienne faible (+)
- Diamètres de 10 à 11,9 mm : activité antimicrobienne modeste (++)
- Diamètres de 12 à 15 mm : activité antimicrobienne élevée (+++)
- Diamètres supérieurs à 15 mm : activité antimicrobienne forte (++++)

Matériel et méthodes

Le principe de la méthode est schématisé dans la (Figure 16).

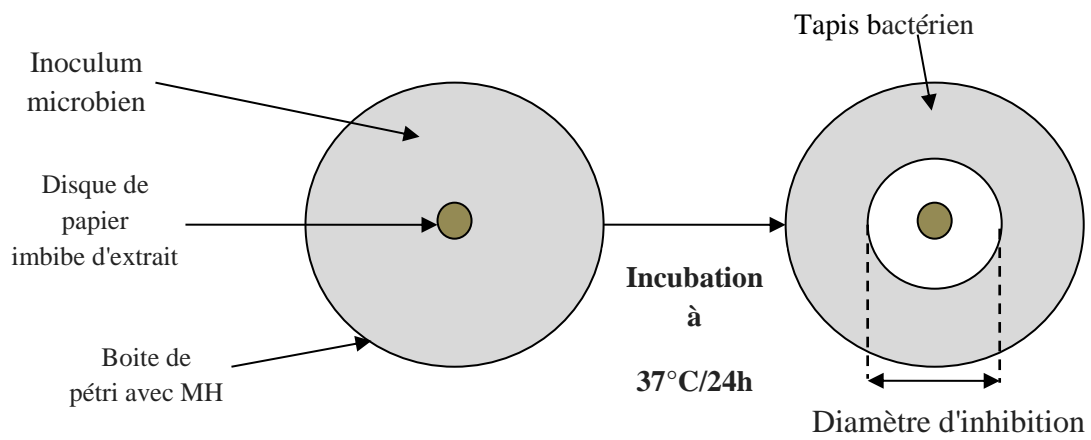


Figure 16 : Principe de la méthode de diffusion des disques

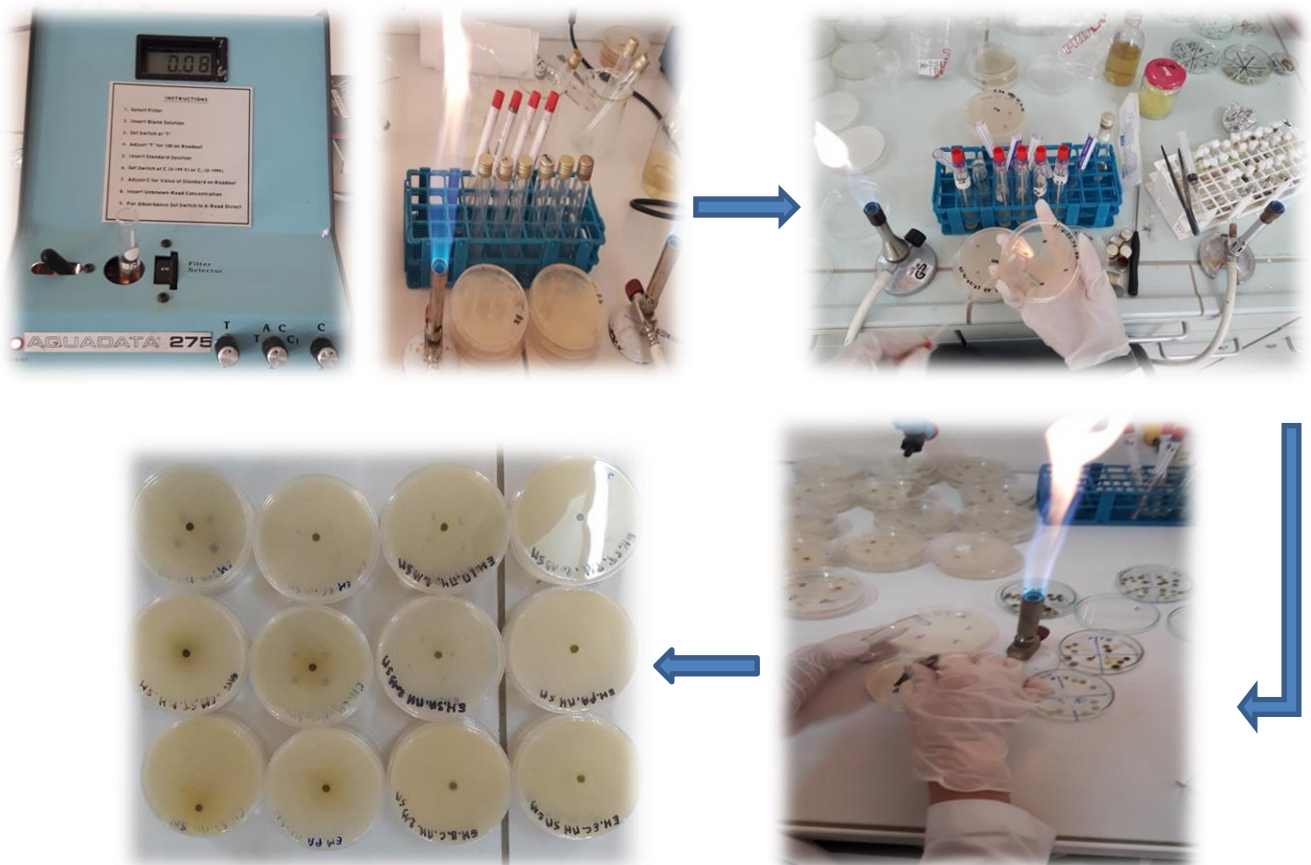


Figure 17 : Etapes suivies de la méthode de diffusion des disques

2.4.3. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) :

Nous avons utilisé la méthode décrite en 2002 par Clinical and Laboratory Standards Institute M27-A2 (CLSI). C'est la méthode de référence qui permet de tester l'efficacité des antifongiques et de déterminer les CMI et les CMF correspondantes (CLSI-M27-A2, 2002). La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme étant la concentration la plus faible de la substance antimicrobienne qui inhibe la croissance des microorganismes. Cette méthode est réservée uniquement pour les bactéries aérobies non exigeantes.

Le principe de cette méthode est d'évaluer la capacité des bactéries et les levures à produire une croissance visible dans les puits d'une microplaque à fond rond (à 96 puits) contenant le milieu de culture liquide, en présence de concentrations en cascade d'huile essentielle et des extraits de la plante. Le milieu de culture préconisé pour cette technique est le bouillon Muëller Hinton (pH de 7,2 à 7,4) est largement utilisé comme milieu standard pour cette méthode. Ce bouillon est considéré comme milieu de référence (Halla, 2010).

a. Préparation des extraits

Une dilution en cascade est effectuée par l'homogénéisation de 1g de l'extrait *d'Artemisia campestris* dans 2ml bouillon de Muëller Hinton (1,5ml de bouillon de Muëller Hinton supplémenté en 0,5ml de Tween 80 pour l'huile essentielle) Ensuite, homogénéisé à l'aide d'un agitateur vortex et filtrée aseptiquement avec un filtre millipore stérile, pour obtenir une gamme de concentration décroissante. (Burt, 2004)

b. Préparation de l'inoculum :

A partir de nos précultures bactériennes et fongiques nous avons prélevé quelques colonies (5 colonies pour les bactéries et 2 colonies pour les levures) à l'aide d'une anse de platine et nous avons les re-suspendues dans du bouillon de Muëller Hinton pour les bactéries et bouillon de Sabouraud pour les levures. Elles sont ensuite placées dans une étuve jusqu'à l'obtention d'une concentration cellulaire de 10^6 cellules/ ml (une DO de 0.06 à $\lambda = 625\text{nm}$ pour les souches bactériennes et $\lambda = 580\text{ nm}$ pour les souches fongiques), cette méthode de préparation est approximativement ressemblante à celle de (Mohapatra et al., 2011).

c. Préparation de la microplaque :

Pour chaque ligne de la microplaque, nous avons déposés 50 μ l de l'inoculum dans les 12 puits à l'exception du puits N°12 qui contient seulement du milieu de culture comme témoin positif

(100 μ l) qui sert au contrôle de contamination. Nous avons ensuite ajouté 50 μ l de la solution de l'huile essentielle dans les puits à l'exception du puits N°11 et puits N°12. Le puits N°11 est le témoin négatif (croissance sans extraits). Les plaques sont scellées et placées dans une étuve à 35°C pendant 24 heures (**figure 18**) (CLSI-M27-A2, 2002).

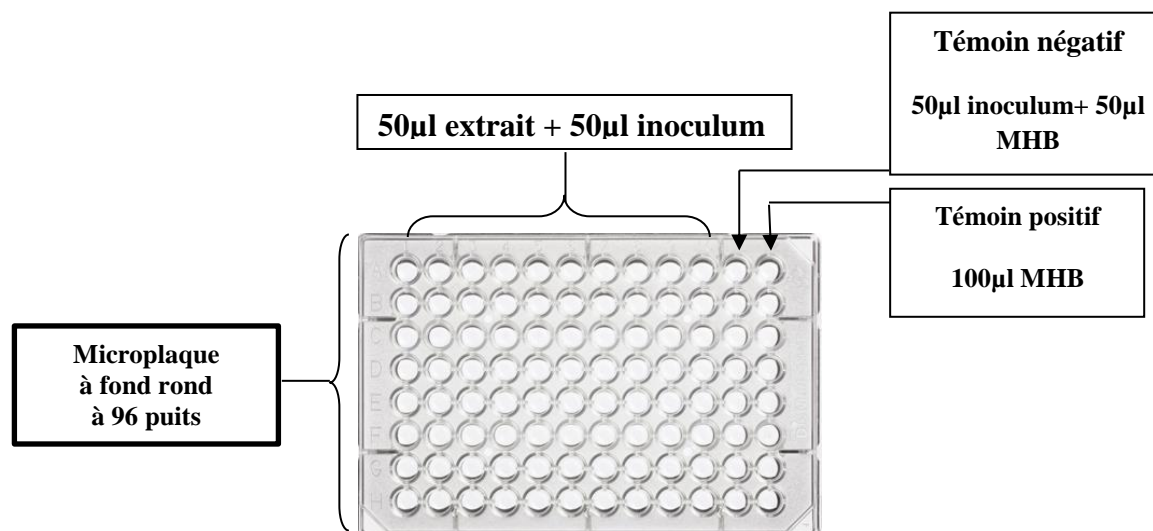


Figure 18: méthode d'utilisation de la microplaque à 96 puits

La lecture du résultat s'effectue à l'œil nu pour visualiser s'il y a une inhibition ou non (la croissance sous forme d'un trouble). La plus faible concentration de chaque fraction ne montrant aucune croissance sera considérée comme la concentration minimale inhibitrice (CMI), elle est confirmée par la recherche de la CMB.

2.4.4. Détermination des concentrations minimales bactéricides (CMB) et fongicides (CMF) :

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

La CMB est définie comme la plus faible concentration de l'antibactérien qui détruit 99,9% de la concentration cellulaire finale. Après la détermination de la CMI (durant 24h d'incubation à 37°C), les deux puits contenant les concentrations en extraits strictement supérieures à la CMI vont servir pour la détermination de la CMB. Pour ce faire, un échantillon de 10 μ l de chaque puits (ne présentant pas de croissance) va être transféré dans des boîtes de Pétri contenant du milieu Gélose nutritive. Les boîtes sont incubées dans une étuve à 37°C pendant 24 h.

Cette technique nous permet de vérifier si les cellules sont viables et cultivables. La boîte de celle de la CMB renferme un nombre de colonies inférieur à 3 (Prescott *et al.*, 1995).

b. Détermination de la concentration minimale fongicide (CMF) :

La CMF est définie comme la plus faible concentration de l'antifongique qui tue 99,9% de la concentration cellulaire. Cette méthode est en accord avec les exigences de la CLSI « Clinical and Laboratory Standards Institute » (Espinelungroff et Canton, 2007).

Après la détermination de la CMI (durant 24h d'incubation à 35°C), les deux puits contenant les concentrations de substances antifongiques strictement supérieures à la CMI vont servir pour la détermination de la CMF. Pour ce faire, 10 µl de chaque puits vont être transférés dans des boîtes de Pétri contenant du milieu Sabouraud gélose. Les boîtes sont incubées dans une étuve à 35 °C pendant 48 h. Cette technique nous permet de vérifier si les cellules sont viables et cultivables. La boîte correspondant à la CMF renferme un nombre de colonies inférieures à 3 (Majoros et al., 2005).



Figure 19 : préparation des boîtes de pétri pour le test de la CMB

2.5. Etude de l'effet antibactérien de l'extrait d'*Artemisia campestris* :

2.5.1. Conditions expérimentales générales

La dilution des extraits sont réalisées par la solution tampon phosphate (PBS) et la gamme des concentrations de l'extrait utilisé ont été choisies selon les CMI et CMB précédemment déterminées. Ces concentrations sont : 1/2 CMI, CMI, CMB et CMBx2 représentées en **Tableau 10**. La solution tampon utilisée pour ces tests est la solution tampon phosphate (PBS).

Tableau 10: Concentrations utilisées pour l'étude des mécanismes d'action

	CMI/2	CMI	CMB	CMB x2
Concentrations (mg/ml)	0,097	0,39	1,56	6,25

La suspension bactérienne (la phase exponentielle de croissance) de la souche *Staphylococcus aureus* a été préparée par inoculation de cinq colonies (05) d'une culture jeune de bactéries dans 50 ml de Mueller-Hinton bouillon. Ensuite, elle a été incubée à 37°C pendant 4-5 h sous agitation. Après l'incubation, les bactéries ont été séparées au milieu de culture par centrifugation à 5000 tr/min durant 20 min à 4°C, ensuite le culot bactérien est lavé deux fois par la solution PBS (pH 7.4) (Carson et al., 2002).

2.5.2. Tests de la viabilité cellulaire

Les tests de la viabilité cellulaire ont été réalisés par un comptage des cellules viables sur milieu solide. Des volumes de 500 µl des concentrations finales C1, C2, C3, C4 ont été prélevés, dilués en série dans l'eau peptonée stérile (0.1 g 100 ml⁻¹), puis versés sur des boîtes coulées par un neutraliseur stérile, suivie d'ensemencement par inondation (De Barros et al., 2009). Après 24 h d'incubation à 37°C, les colonies ont été comptées et le nombre de cellules viables rapporté comme unités formant des colonies (UFC) par ml et les résultats ont été exprimés en Log d'UFC/ ml. Des tubes de contrôle sans extrait ont été testés de la même façon (Carson et al., 2002).

2.5.3. Test de la tolérance au sel :

La capacité des cellules de *S. aureus* traités avec l'extrait méthanolique d'*Artemisia campestris* à croître sur un milieu de culture solide additionné de NaCl a été étudiée. Une quantité de 100 µl de cultures ont été diluée dans de l'eau peptonée stérile et ont été étalée sur GN-NaCl (Carson et al., 2002). Les tubes de contrôle sans extrait ont été testés de la même façon. Après 24 h d'incubation, le nombre d'UFC/ml sur chaque boîte GN-NaCl ont été comparés à ceux obtenus pour l'essai de contrôle, et les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules capables de former des colonies.

2.5.4. Test de l'activité des lipases :

L'activité de la lipase a été évaluée sur le milieu de culture Agar Salty Tween - AST (Nostro et al., 2001) à pH 7,2. Des cultures cellulaires diluée dans de l'eau peptonée stérile ont été étalées sur l'AST, suivie à incubation à 37°C pendant 24 h. Après la période d'incubation, le nombre de colonies (UFC/ml) présentant une activité de lipase positif sur chaque boîte AST ont été comptées, et les résultats ont été exprimés en pourcentage de cellules capables de former des colonies (De Barros et al., 2009).

2.6. Etude de la cytotoxicité vis-à-vis les érythrocytes :

2.6.1. Préparation des solutions :

a. Préparation des solutions mères des extraits : Le choix des concentrations mères du travail est selon les résultats du test de concentrations minimales inhibitrices. Les solutions ont été préparées dans des conditions hygiéniques, puis chaque extrait est conservé dans une température de 4°C à l'abri de la lumière.

b. Préparation de la solution de lavage : La solution de lavage consiste à préparer une solution de MgCl₂ à 2mM contenant 150mM de NaCl.

c. Préparation de la solution tampon PBS : Pour préparer un litre de PBS 100mM, il suffit de mélanger une quantité suffisante pour 20mM de KH₂PO₄ et une quantité suffisante pour 80 mM de NaHPO₄ additionnée par 150mM de NaCl. Compléter à 1000mL avec de l'eau distillée.

2.6.2. Etude de la cytotoxicité de la plante *Artemisia campestris* :

a. Préparation de la suspension érythrocytaire :

Du sang frais est prélevé sur des tubes héparinés d'un volontaire sain qui n'a pas pris d'anti-inflammatoires dans les 48h qui précèdent le prélèvement. Le sang est centrifugé à 4000 tours/minutes pendant 5 minutes. Après l'élimination du surnageant, le culot est lavé 2 fois avec la solution de lavage de chlorure de magnésium MgCl₂ (à 2mM) contenant 150mM de NaCl, puis resuspendu à nouveau dans le tampon phosphate salé de sodium (PBS) 100mM, avec un pH 7,4 contenant aussi 150mM de NaCl (l'Okokoet, 2012).

b. Evaluation de cytotoxicité vis-à-vis les globules rouges :

Afin d'étudier la cytotoxicité de la plante, nous avons suivi le protocole de **Halla (2010)**. Les globules rouges sont suspendus dans du tampon PBS pH 7,4 100mM, à raison de 4000 cellules/ml. La suspension érythrocytaire est incubée à 37°C sous agitation continue pendant 120 minutes. Dès l'addition de la solution du conservateur à des concentrations finales différentes. Des prélèvements de 500µl à partir de la solution réactionnelle sont effectués à intervalles réguliers auxquels nous avons ajouté 2ml d'une solution de lavage glacée NaCl. Après centrifugation à 4000 tours/minutes pendant 5 minutes, nous avons récupéré le surnageant dans lequel on dose l'hémoglobine à l'aide d'un spectrophotomètre par la densité optique à une longueur d'onde de 548nm (**figure 20**).

$$\text{Pourcentage d'hémolyse} = (\text{D.O témoin} - \text{D.O extrait} / \text{D.O témoin}) \times 100$$

- D.O témoin : absorbance du témoin négatif
 - D.O extrait : absorbance de l'extrait
-

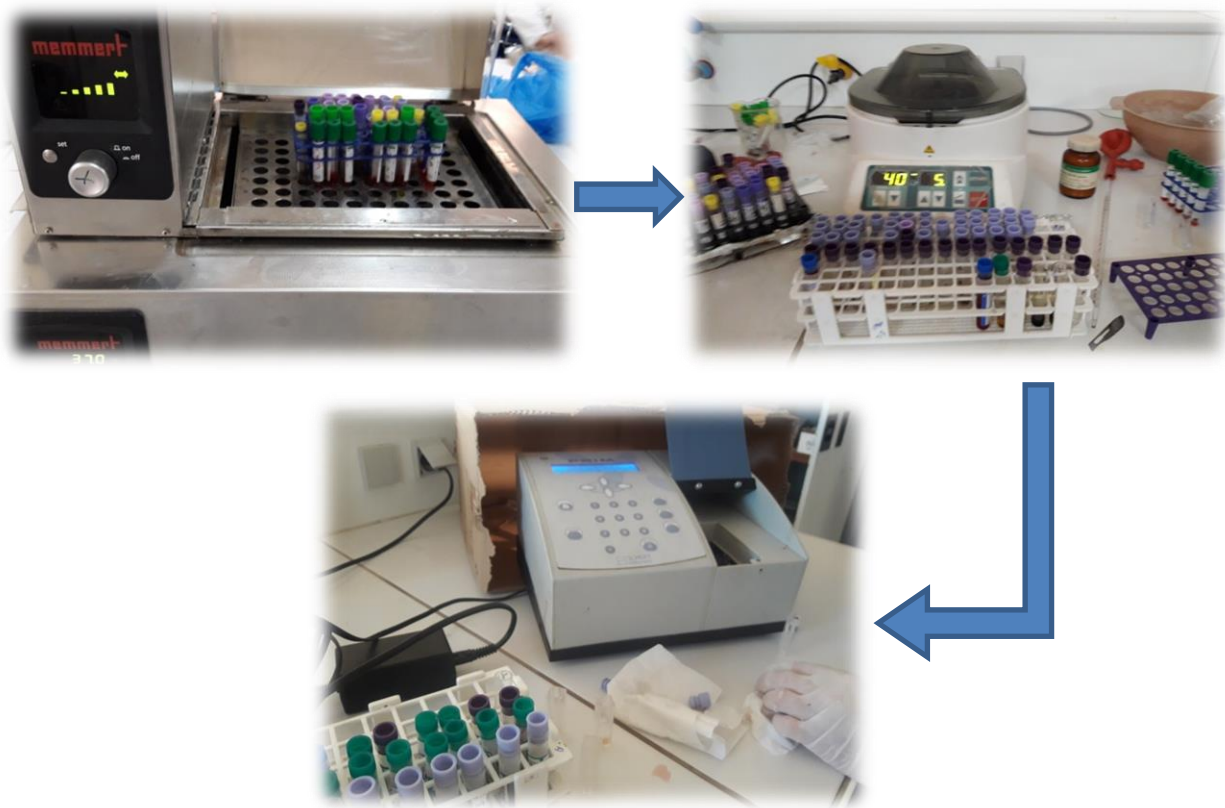


Figure 20 : procédure de l'évaluation de la cytotoxicité de la plante vis-à-vis les érythrocytes

2.7. Etude statistique :

Tous les histogrammes ainsi que les graphes sont tracés par le programme Excel2010. Les valeurs d'IC50 ont été calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe [% inhibition = f(concentrations)].

Résultats et discussion

1. Rendement des extraits :

La préparation des extraits à partir de la partie aérienne d'*Artemisia campestris* a été effectuée par des différentes méthodes d'extraction et des solvants à différentes polarités (hexane, méthanol et l'eau distillée). Cette extraction a permis d'obtenir trois extraits bruts: extrait hexanique, l'extrait méthanolique, l'extrait aqueux.

Le rendement des extraits est exprimé en pourcentage de masse d'extrait par rapport à la masse de la plante séchée, le rendement le plus élevé a été observé en extrait aqueux (**9,21%**), suivie par l'extrait méthanolique (**7,37%**), et enfin l'extrait hexanique (**6,12%**). Cependant, les huiles essentielles ont marqué le rendement le plus faible par un pourcentage de **1,25%**, les résultats obtenus sont représentés dans le **Tableau 11** et la **figure 21**.

Tableau 11 : Rendements massiques des extraits d'*Artemisia Campestris*

Rendement (%)	Extrait hexanique	6,12
	Extrait méthanolique	7,37
	Extrait aqueux	9,21
	Les huiles essentielles	1,25

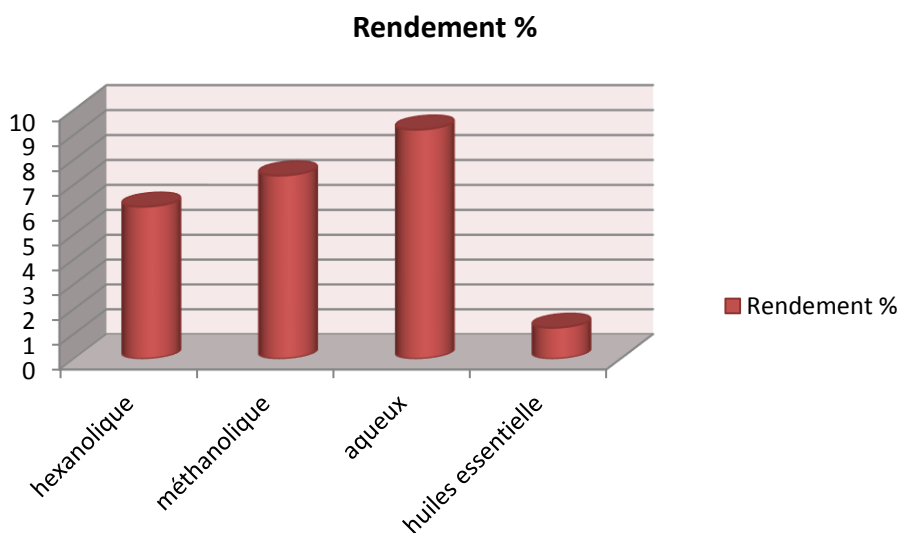


Figure 21: Histogramme représentant les différents rendements des différents extraits d'*Artemisia campestris*





Il est important de souligner que la méthode utilisée (le choix des solvants), ainsi que les conditions dans lesquelles l'extraction est effectuée (à chaud ou à froid), affectent tous le contenu total en phénols et flavonoïdes, et par conséquent affecte les activités biologiques médiées par ces métabolites (Lee et al., 2003).

Dans une étude réalisée par Benrebiha et Touil, (2011) a montré que le rendement de l'huile essentielle extraite d'*Artemisia campestris* (0,7 %) est très élevé de celui obtenu à partir d'*A. herba alba* (0,3 %). Cependant ce taux de rendement était de l'ordre de 1.2% et 1.4 % (ml/100g) d'*A. campestris* récoltée au Tunisie et en France, respectivement. La grande variabilité observée des rendements en huile essentielle selon l'âge de la plante de l'espèce *Artemisia campestris*, montre clairement l'influence des facteurs biologiques et physiologiques (cycle végétatif), si on se réfère à quelques données de la littérature. A la différence de la macération qui se déroule à température ambiante, l'extraction au Soxhlet se fait à la température d'ébullition du solvant, ce qui entraînerait la dégradation thermique des composés thermosensibles (Popovici et al., 2009).

2. Aspect physique des extraits d'*Artemisia campestris*:

L'aspect physique ainsi que les couleurs obtenus lors de l'extraction d'*Artemisia campestris* sont représenté dans le **tableau 12**.

Tableau 12: Aspect physique de différents extraits d'*Artemisia campestris*

Extrait	Aspect	Couleur	
Hexanique	Pâteux, collant	Vert foncé	
Méthanolique	Pâteux, collant	Vert brunâtre foncé	
Aqueux	poudre	Brune	
Huiles essentielles	Liquide visqueux	Vert noirâtre	

L'huile essentielle de la partie aérienne d'*Artemisia campestris* obtenue par la méthode d'entraînement à la vapeur est un liquide visqueux, d'une couleur vert noirâtre avec une forte odeur caractéristique.

La préparation des extraits à partir de la partie aérienne d'*Artemisia campestris* a été effectuée par des solvants à polarité croissante il s'agit d'Hexane, Méthanol et l'eau distillée. Les extraits méthanolique et hexanique ont un aspect pâteux collant avec une couleur vert brunâtre et vert foncé respectivement, contrairement à l'extrait aqueux qui est une poudre d'une couleur brune.

3. Tests phytochimiques :

Les tests phytochimiques consistent à identifier les différentes familles des métabolites secondaires, en réalisant une analyse qualitative des extraits de la plante par des essais de solubilités des constituants, des réactions de précipitation et de turbidité, par un changement de couleur spécifique ou un examen sous la lumière ultraviolette, avec des solvants de polarité différente et des réactifs spécifiques de révélation (El mouloud, 2016).

Les résultats des tests phytochimiques réalisés sur la partie aérienne d'*Artemisia campestris* sont résumés dans le tableau 13 :

Tableau 13 : Résultats du screening phytochimique d'*Artemisia campestris*.

Métabolites secondaires		Extrait méthanolique	Extrait aqueux	Extrait hexanique
Alcaloïdes	Dragendorff	+	+	+
	Mayer	+	+	-
	Wagner	+	+	-
Tanins		+	+	-
Flavonoïdes		-	-	-
Coumarines		+	-	-
Saponines		+	-	-
Stérols		+	-	-
Composés réducteurs		-	-	-
Triterpènes		+		-
Anthocyanes		+	+	-
Quinones		+		-

+ : présence du composé ; - : absence

Les figures suivantes (22, 23 et 24) représentent les résultats des extraits étudiés :








				
Test de Mayer	Test de Dragendorff	Test de Wagner	temoin	testé
Les alcaloïdes			Coumarines	
				
anthocyanes	tanins	Stérols et triterpènes	Quinones	flavonoïdes

Figure 22 : Résultats de screening phytochimique de l'extrait méthanolique









				
Test de Mayer	Test de Dragendorff	Test de Wagner	temoin	testé
Les alcaloïdes			Coumarines	
				
Composés réducteurs	Tanins	Stérols et triterpènes	Quinones	flavonoïdes

Figure 23: résultats de screening phytochimique de l'extrait aqueux




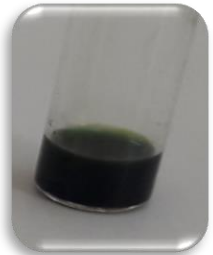





				
Test de Mayer	Test de Dragendorff	Test de Wagner		
Les alcaloïdes			Coumarines	
				
Anthocyanes	tanins	Stérols et triterpènes	Quinones	Flavonoïdes

Figure 24: résultats de screening phytochimique d l'extrait Hexanique

Sur l'ensemble des résultats obtenus, nous avons pu prendre une idée générale sur la composition chimique de la plante étudiée. En effet, nous pouvons conclure qu'*Artemisia campestris* est plus ou moins riche en métabolites secondaires, particulièrement l'extrait méthanolique qui a révélé la présence des familles chimiques; les tannins catéchiques, les anthocyanes, les coumarines, stérols et les triterpènes, les saponines et les alcaloïdes. Cependant, nous avons observé l'absence des coumarines dans notre extrait (hexanique et aqueux).

Ainsi, nous avons marqué la présence des polyphénols (les tannins et les anthocyanes) et les alcaloïdes dans l'extrait aqueux et méthanolique (extraits polaires). En revanche, nous avons enregistré l'absence des composés réducteurs dans tous les extraits préparés.

L'extrait hexanique n'a montré aucune présence des métabolites secondaires par le screening phytochimique utilisé, qui est peut-être à cause de la méthode d'extraction ainsi que la polarité du solvant utilisé qui entraîne des molécules totalement apolaires.

En comparant nos résultats avec d'autres études effectuées dans d'autres régions, nous trouvons que notre espèce *Artemisia campestris* est riche en alcaloïdes, tanins, flavonoïdes et les saponines comparée à celle d'Aflou- Laghouat étudiée par **Benattia (2015)**, qui ne renferme que les alcaloïdes, les tanins et les flavonoïdes. Similairement, l'étude de **Talbi (2015)** sur la plante *Artemisia campestris* récoltée à Djelfa a signalé que cette espèce ne contient que les tanins, les flavonoïdes, les saponines et les anthraquinones libres.

4. Evaluation de l'activité antioxydante d'*Artemisia campestris*:

A travers nos recherches bibliographiques et compte tenu de la complexité des processus d'oxydation. Il apparaît clairement qu'une seule méthode n'est pas suffisante pour caractériser le potentiel antioxydant d'un échantillon. Il faut donc combiner les réponses obtenues à l'aide de tests différents et complémentaires.

C'est pourquoi notre choix s'est porté sur l'utilisation de deux méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant de la plante *Artemisia campestris*.

4.1. Capacité antioxydant totale (CAT) :

La capacité antioxydante totale des extraits étudiés est exprimée en nombre d'équivalents d'acide gallique à partir d'une courbe d'étalonnage ($y = 0,0007x + 0,004$; $R^2 = 0,982$) (**Figure 25**). Les résultats obtenus sont exprimés en μg en parallèle à l'acide gallique par mg de l'extrait sec. C'est un test quantitatif puisque les résultats sont exprimés en nombre d'équivalents d'acide gallique.

La **figure 25** représente la courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

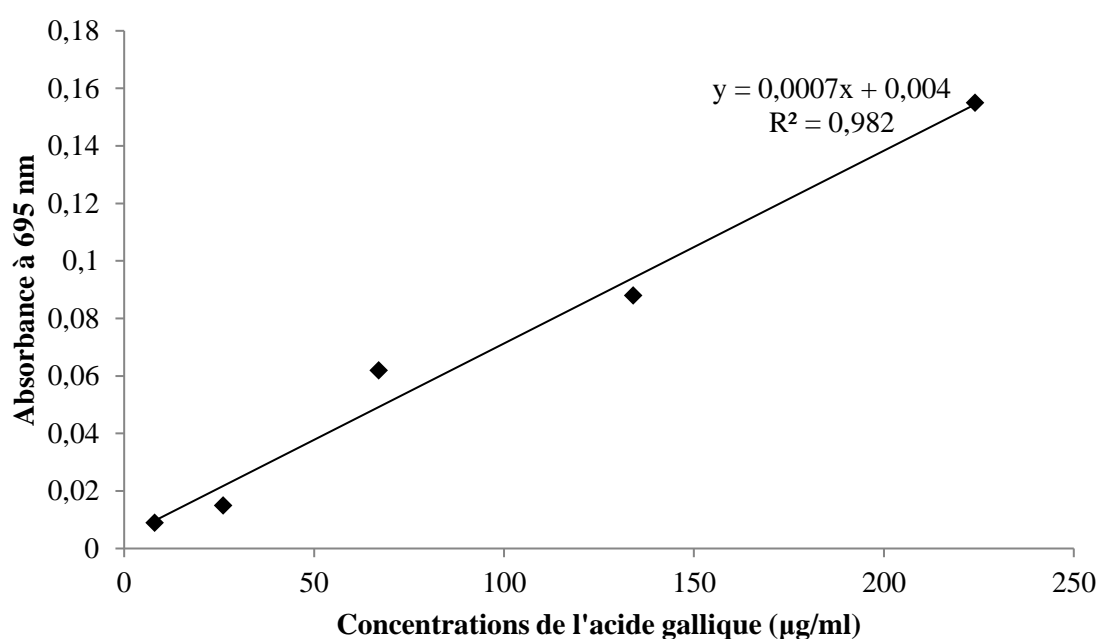


figure 25 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour la détermination de la capacité antioxydante totale

Les résultats de la capacité antioxydante total des extraits d'*Artemisia campestris* sont représentés dans **la figure 26**.

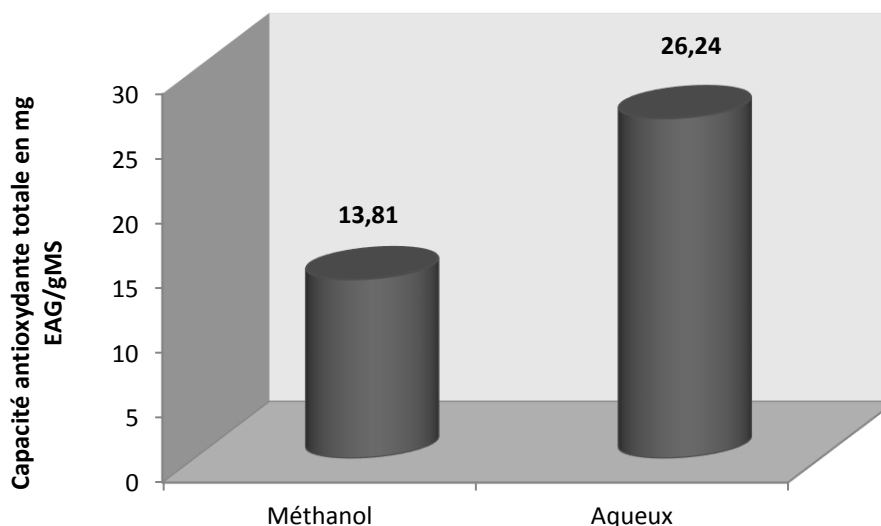


Figure 26 : Capacité antioxydante totale des extraits méthanolique et aqueux de la plante *Artemisia campestris*

D'après ces résultats, l'estimation de la capacité antioxydante totale des extraits a montré une variabilité en fonction de la nature du solvant (Méthanol, l'eau distillé) utilisé pour l'extraction, donc nous avons remarqué qu'à la concentration 500mg/ml de l'extrait aqueux avait un pouvoir antioxydant élevé (26,24mg EAG/g MS) par rapport à l'extrait méthanolique (13,81mg/g MS). Donc, l'estimation de la capacité antioxydante total des extraits bruts a montré une importante variabilité en fonction de l'organe étudié et la nature du solvant utilisé pour l'extraction.

4.2. Test d'activité anti-radicalaire (DPPH) :

Les activités anti-radicalaires des extraits d'*Artemisia campestris* et du témoin positif (acide ascorbique) ont été déterminées par la méthode au DPPH. L'activité anti-radicalaire de nos extraits est exprimée en IC_{50} . Pour chaque extrait la IC_{50} est déduite de la droite d'étalonnage correspondante **Figure 27**.

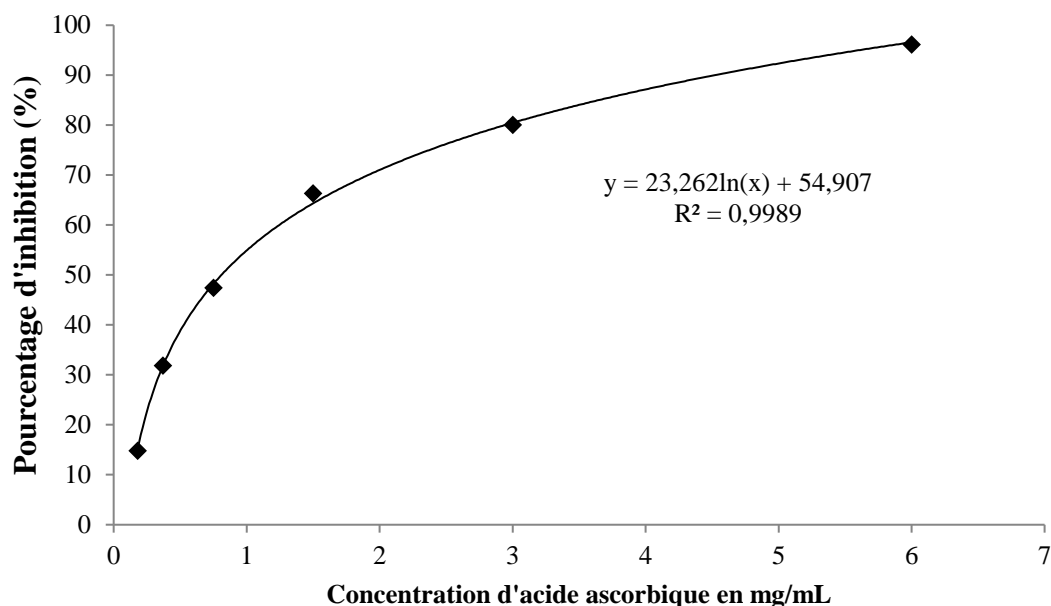


Figure 27: Courbe des pourcentages d'inhibition de l'acide ascorbique à différentes concentrations pour la mesure de pouvoir de piégeage du radical DPPH

En faisant varier la concentration des extraits et en calculant le pourcentage d'inhibition correspondant (PI%) pour chaque concentration, nous avons établi les profils d'activités anti radicalaires présentes dans la **figure 28** et la **figure 29**, et c'est à partir de ces profils que nous avons déduit la valeur correspondante à la IC₅₀ (la concentration d'extrait requise pour inhiber 50% du radical libre initial de DPPH).

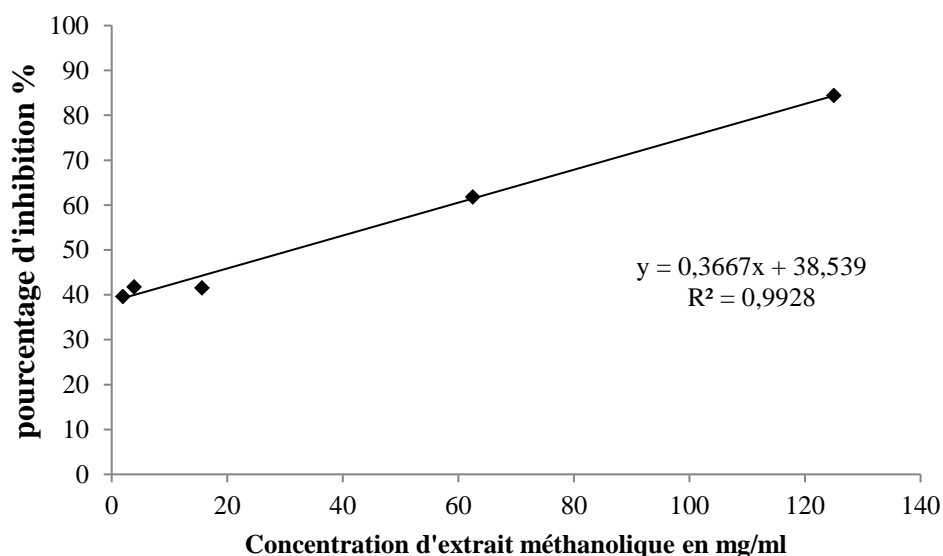


Figure 28 : Profil de l'activité antiradicalaire (test DPPH) d'extrait méthanolique

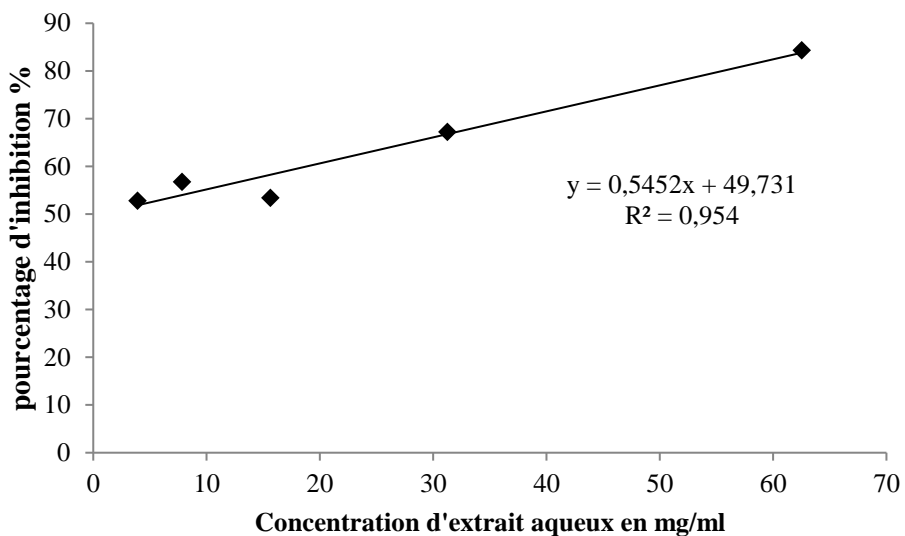


Figure 29: Profil de l'activité antiradicalaire (test DPPH) de l'extrait aqueux

Les résultats obtenus sont représentés sous forme de droite sont comme des équations dans le tableau 14.

Tableau 14 : Résultats de l'activité anti radicalaire des extraits d'*Artemisia campestris*

Extraits	IC ₅₀ (mg /ml)	Y =f(x)	R ²
Extrait méthanolique	31,25	$y = 0,3667x + 38,539$	0,9928
Extrait aqueux	0,49	$y = 0,2219x + 53,173$	0,9567
Acide ascorbique	0,81	$Y=23,262\text{Ln}x+ 54,907$	0,9989

Les profils de l'activité anti-radicalaire obtenus révèlent que les extraits testés possèdent une activité dose-dépendante et les valeurs des IC_{50} Présentées dans le tableau ci-dessus, nous permettent d'évaluer et de comparer l'efficacité des extraits. Nous rappelons que plus la valeur de la IC_{50} est faible plus l'extrait est puissant vis-à-vis des radicaux libres (**Beddou, 2015**).

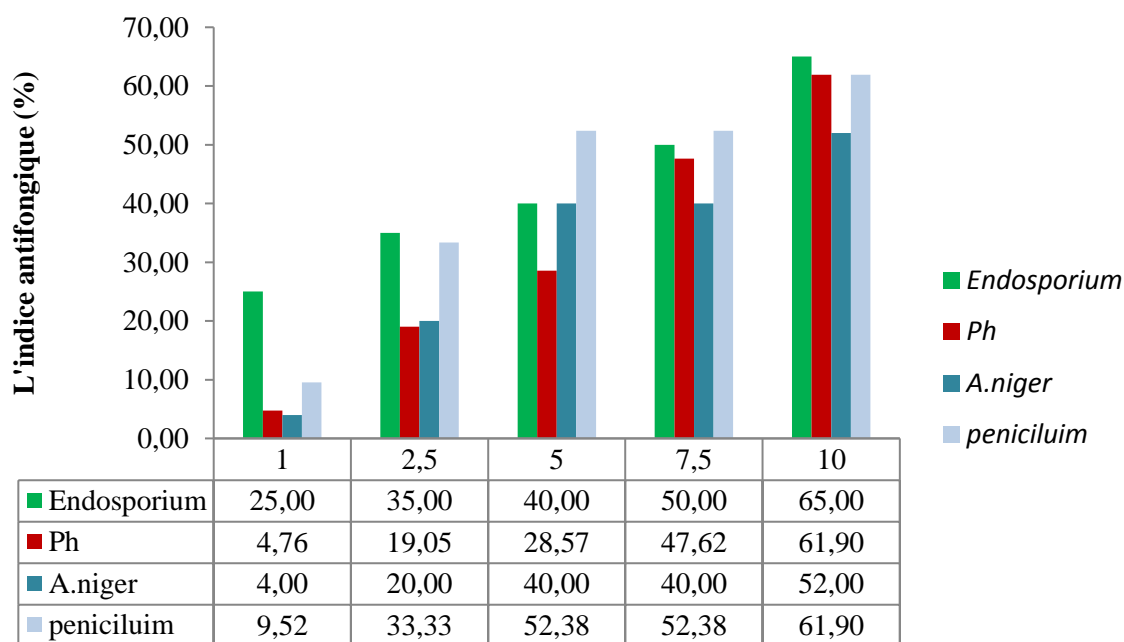
Nous avons remarqué qu'il existe une augmentation proportionnelle des pourcentages d'inhibition (%) en fonction des concentrations des deux extraits d'*Artemisia campestris*. Cette proportionnalité a permis d'obtenir une courbe linéaire. Par comparaison, l'extrait aqueux avait une forte activité anti radicalaire par rapport le témoin (acide ascorbique) par une IC_{50} de l'ordre de 0,49mg /ml, cependant le macèrent méthanolique avait une activité moyenne à $IC_{50}= 31,25$ mg/ml.

Il a été démontré que les molécules antioxydantes telles que l'acide ascorbique, tocophérol, flavonoïdes et les tanins réduisent et décolorent le DPPH en raison de leur capacité à céder l'hydrogène (**Bougandoura et Bendimerad, 2012**). **Lopes-Lutz et al., (2008)** ont confirmé dans une étude faite sur quelques espèces d'*Artemisia* que l'activité antioxydante de ces plantes est faible. En outre, **Kang et al., (2003)** ont suggéré que les extraits des végétaux qui contiennent des molécules polaires montrent une activité anti radicalaire élevée.

5. Evaluation de l'activité antimicrobienne :

5.1. Activité antifongique de la plante *Artemisia campestris* :

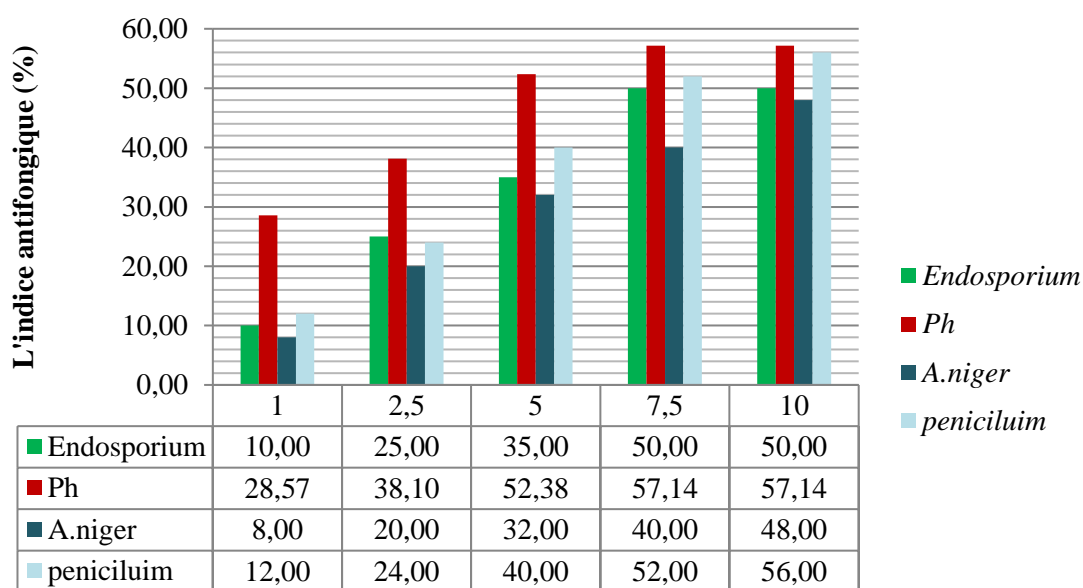
L'activité antifongique de la plante *Artemisia campestris* a été évaluée vis-à-vis quatre espèces fongiques par un traitement avec des différentes concentrations des extraits de la plante, les données expérimentales traduites sous forme de tableaux et d'histogrammes sont résumées dans **la figure 30 et la figure 31**.



Concentration de l'extrait Hexanique d'*Artemisia campestris* (µl/ml)

Figure 30 : effet antifongique de l'extrait hexanique d'*Artemisia campestris*

La figure 30 représente l'activité de l'extrait hexanique qui a marqué un effet inhibiteur vis-à-vis la souche *Endosporium spp* avec un indice antifongique égal à 65% à la concentration de 10µl/ml. Par contre, la souche *Aspergillus niger* est la souche la plus résistante. La souche *Phytophthora infestans* a montré une résistance à la concentration de 1µl/ml, puis une sensibilité qui augmente au fur et à mesure que la concentration.



Concentration de l'extrait méthanolique d'*Artemisia campestris* (µl/ml)

Figure 31 : effet antifongique d'extrait méthanolique d'*Artemisia campestris*

L'action de l'extrait méthanolique d'*Artemisia campestris* sur la croissance mycélienne élucidée dans **la Figure 31** exprime une sensibilité des moisissures, notamment la souche de *Phytophthora infestans* avec un indice de 57,14% en concentrations 7,5 µl/ml et 10 µl/ml qui est marqué comme le plus élevé et sur *Penicillium spp* (56%) en concentration 10µl/ml.

L'effet de l'extrait méthanolique était moins actif sur l'*Aspergillus niger* qui était la souche la plus résistante par rapport au reste des moisissures par un indice de 8% en concentration 1µl/ml et un indice de 48% avec la concentration de 10µl/ml.

Par comparaison entre l'extrait hexanique et l'extrait méthanolique, nous remarquons que l'extrait hexanique exerce une activité antifongique plus significative avec un indice antifongique qui atteint à 65% à la concentration 10µl/ml, à l'aune des résultats d'extrait méthanolique qui représente une activité modeste avec un indice antifongique de 57%. De ce fait, nous pouvons conclure que l'extrait hexanique contient des substances antifongiques à une forte activité par rapport au deuxième extrait utilisé dans cet essai antifongique.

Aspergillus niger est désignée comme l'espèce la plus résistante aux extraits méthanolique et hexanique avec un indice antifongique de 8% et 4%, respectivement à la concentration de 1µl/ml. Alors que *Phytophthora infestans* était la plus sensible avec l'extrait méthanolique (57,14%) et l'*Endosporium spp* (65%) avec l'extrait hexanique.

La sensibilité des espèces fongiques dépend de la composition chimique en métabolites secondaires et est en fonction de la nature des substances naturelles à caractère antimicrobien et antifongique (**Giordani et al., 2008**), des études fondamentales ont également montré que les alcools et les terpènes ont une activité antifongique (**Knobloch et al., 1989**).

L'étude de **Karabegović et al., (2011)** sur l'extrait méthanol des tiges d'*Artemisia campestris* L. a révélé des différents pourcentages d'inhibition contre *Aspergillus niger* qui a révélé une zone d'inhibition estimée à 32,5-33 mm qui apparait plus importante que celle de l'érythromycine (20,5 mm) et du tartrate de tylosine (18mm).

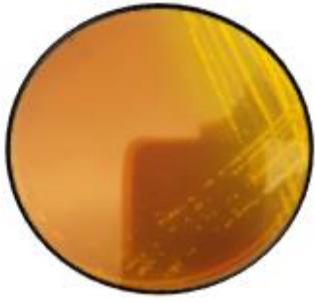
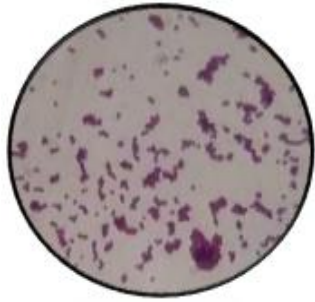
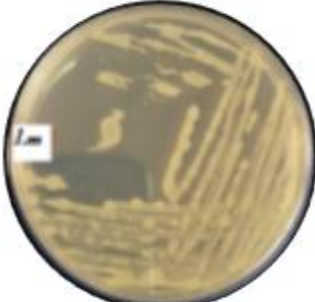
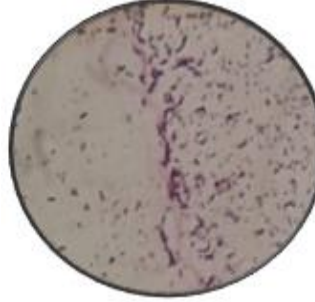
5.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne d'*Artemisia campestris* :

L'activité antibactérienne in vitro des extraits d'*Artemisia campestris* a été évaluée qualitativement et quantitativement par la présence ou l'absence de zones d'inhibition et de la CMI et la CMB ou CMF, respectivement.



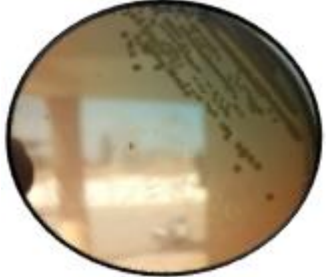


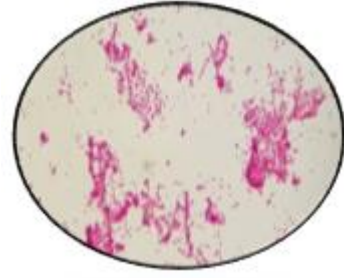


5.2.1. Identification des bactéries :

Nous avons confirmé l'identification des souches testées par un examen macroscopique par des milieux sélectifs et ainsi que par un examen microscopique par la coloration de gram. Les résultats obtenus ont présenté dans le **tableau 15**.

Tableau 15 : résultats d'identification macroscopique et microscopique des souches utilisées.

Souches	Résultats macroscopique	Résultats microscopique	Observations
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923			<ul style="list-style-type: none">• Gram+• Coque en amas• Colonie crémeuse ronde et pigmenté en jaune (doré)
<i>Lestiria monocytogenes</i> ATCC 19115			<ul style="list-style-type: none">• Gram +• Petite bacille• Colonies transparentes crémeuses.

Suite **Tableau 15**

Souches	Résultats macroscopique	Résultats microscopique	Observations
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778			<ul style="list-style-type: none"> • Gram + • Grande bacille • Colonie circulaires et irrégulières avec un aspect est crémeuse et granuleux.
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922			<ul style="list-style-type: none"> • Gram- • Bacilles • Colonies rondes, plates et réguliers. • couleur saumon sur gélose hektoen
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853			<ul style="list-style-type: none"> • Gram- • Fin bacille • Bâtonnets • Pigment (jaune-vert fluorescent)
<i>Salmonella</i> <i>Thyphimurium</i> ATCC 13311			<ul style="list-style-type: none"> • Gram – • Bacilles • Colonie ronde • A borde régulier

5.2.2. Méthode de Diffusion des disques sur gélose :

Le premier test réalisé pour étudier l'effet d'*Artemisia campestris* est la méthode de diffusion de disques qui est une technique qualitative basée sur la détermination du diamètre des zones d'inhibition apparentées autour des disques chargés par les extraits testés. Les résultats obtenus de l'extrait méthanolique sont représentés dans le **tableau 16**.

Tableau 16 : Valeurs des diamètres d'inhibition de l'extrait méthanolique

Concentration (mg/ml)	Diamètres des zones d'inhibition (mm)								
	500	250	125	62,50	31,25	15,62	7,81	3,90	1,95
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	9	8	8	8	0	0	0	8	0
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0	9	9	8	8	0	0	0	0
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	0	14	16	15	18,5	0	0	0	0
<i>E. coli</i> ATCC 25922	10	9	12	8	9	0	0	0	0
<i>S. Thphimrium</i> ATCC 13311	7	9	7	0	0	0	0	0	0
<i>C. albicans</i> ATCC 26790	9	12	10	7	0	8	0	7	9
<i>C. albicans</i> ATCC IP444	9	9	7	8	8	6	7	6	7
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	9	10	10	12	10	7	6	8	6

Suite aux résultats indiquées dans le tableau 16, l'extrait méthanolique d'*Artemisia campestris* a montré une activité inhibitrice importante contre la souche *Bacillus cereus* ATCC 11778 à la concentration 31,25 mg/ml avec un diamètre de 18,5 mm, contrairement au *Lestiria monocytogenes* ATCC 19115 qui a montré une résistante vis-à-vis toutes les concentrations de l'extrait méthanolique.

Les faibles concentrations de l'extrait méthanolique n'exerce aucune activité sur les souches bactériennes étudiées.

L'effet de l'extrait méthanolique sur les souches fongiques *Candida albicans* est varié entre un diamètre de 8 mm à 12 mm qui est considéré comme un effet partiellement actif.

Le deuxième extrait étudié est l'extrait hexanique qui a représenté une activité antimicrobienne exposé en **tableau 17**.

Tableau 17: Valeurs des diamètres d'inhibition de l'extrait hexanique

Concentration (mg/ml)	Diamètres des zones d'inhibition (mm)								
	500	250	125	62,50	31,25	15,62	7,81	3,90	1,95
Souches									
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	7	7	9	8	9	7	7	7	8
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115	9	8	8	7	7	7	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0	0	9	0	0	7		7	
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	9	7	8	7	7	7	7	0	7
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0	8	9	0	0	7	9		
<i>S. Thphimrium</i> ATCC 13311	10	9	8	0	0	0	0	0	0
<i>C. albicans</i> ATCC 26790	12,5	12	13,5	9,5	10,5	0	0	7	8
<i>C. albicans</i> ATCC IP444	9	8	7	9	7	0	7	7	7
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	12,5	10	10	12	10	10	10	7	11

L'extrait hexanique obtenu par une délipiation de la plante a montré une activité antibactérienne très modeste par rapport l'extrait méthanolique vis-à-vis les souches bactériennes testées qui ne dépasse pas les 10 mm. Cependant, les trois souches de *Candida albicans* avaient une sensibilité, notamment *Candida albicans* ATCC 26790 avec un diamètre qui atteint les 13,5 mm à la concentration 125 mg/ml.

Le **tableau 18** élucide les diamètres d'inhibition de l'extrait aqueux.

Tableau 18: Valeurs des diamètres d'inhibition de l'extrait aqueux

Concentration (mg/ml)	Diamètres des zones d'inhibition (mm)								
	500	250	125	62,50	31,25	15,62	7,81	3,90	1,95
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. Thpimrium</i> ATCC 13311	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. albicans</i> ATCC 26790	0	10	8	0	8	8	0	7	0
<i>C. albicans</i> ATCC IP444	11	9	8	8	10	0	0	0	0
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0	0	0	0	9	8	8	0	0

Les résultats de l'infusé de la plante *Artemisia campestris* ont montré une absence totale de l'activité antibactérienne avec toutes les concentrations utilisées, et une activité antifongique approximativement faible variante entre 7 mm et 10 mm.

Le dernier extrait testé est l'huile essentielle de la plante, obtenu par la méthode de l'entraînement à la vapeur, le **tableau 19** représente les résultats de l'effet des huiles essentielles sur les espèces microbiennes étudiées.

Tableau 19: Valeurs des diamètres d'inhibition des huiles essentielles

Concentration (mg/ml)	Diamètres des zones d'inhibition (mm)								
	500	250	125	62,50	31,25	15,62	7,81	3,90	1,95
Souches									
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0	8	9	9	7	0	0	0	0
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. Thphimrium</i> ATCC 13311	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. albicans</i> ATCC 26790	15	12	13	7	9	8	8	8	0
<i>C. albicans</i> ATCC IP444	15	14	9	9	11	0	0	0	0
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	13	9	9	8	0	0	0	7	0

Les diamètres des zones d'inhibition obtenus montrent que les souches *Candida albicans* ont une sensibilité aux huiles essentielles de la plante, estimée par une zone d'inhibition de 15 mm à la concentration mère (500mg/ml).

Staphylococcus aureus ATCC 25923 était la seule souche bactérienne sensible aux huiles essentielles, alors que le reste des souches bactériennes n'avait aucuns résultats.

Au vu des résultats, la croissance de la souche *S. aureus* ATCC 25923 a été inhibée par la plupart des extraits de la plante *Artemisia campestris*, suivie par *B. cereus* ATCC 11778 qui avait la plus grande zone d'inhibition par l'extrait méthanolique avec une zone de 18.5 mm à la concentration 31.25 mg/ml. Quoique, la souche *L. monocytogenes* ATCC 19115 était la plus résistante aux extraits de la plante *Artemisia campestris* ce qui clarifie que cette plante n'avait pas le principe actif létale contre cette souche.

L'extrait aqueux n'a enregistré aucune inhibition avec toutes les souches bactériennes, donc il est clair que cet extrait en plus des huiles essentielles avait une activité antimicrobienne très inférieure presque inexistante.

Les huiles essentielles de la plante *Artemisia campestris* et l'extrait hexanique ont marqué une activité forte vis-à-vis les souches de *Candida albicans* avec des zones qui atteint 15 mm et 13,5 mm, respectivement. Suivie par l'extrait méthanolique qui a exercé une inhibition de 12 mm vis-à-vis *C. albicans* ATCC 10231 à la concentration de 62,5 mg/ml. Finalement, l'extrait

aqueux qui a montré une activité très légère contre les *Candida albicans* qui ne dépasse pas les 11 mm à la dilution la plus concentrée 500mg/ml.

Par conséquent, nous concluons que l'extrait méthanolique de la plante *Artemisia campestris* avait l'activité antibactérienne la plus efficace, et ses huiles essentielles avaient une forte activité vis-à-vis les *Candida albicans*.

Plusieurs recherches scientifiques ont prouvé l'efficacité de l'extrait méthanolique ou de l'huile essentielle de l'*Artemisia campestris* aussi bien sur des bactéries que des levures, ce qui confirme les résultats obtenus de notre étude.

Nos résultats viennent consolider également ceux rapportés dans la littérature que les terpénoïdes et les composés phénoliques montrent la plus grande activité antibactérienne et que la souche *S. aureus* est plus particulièrement sensible à ces composés (Cowman, 1999).

Nous constatons que, indépendamment de la source de l'extrait et de sa concentration, les bactéries à Gram (-) révèlent une résistance vis-à-vis les extraits de la plante *Artemisia campestris*. Cette résistance n'est pas surprenante car elle est en relation avec la nature de leurs membranes externes (imperméables à la plupart des agents biocides) [(Bouزيد et al., 2011) ; (Faucher et Avril, 2002)].

Megdiche-Ksouri et ses collaborateurs (2015) ont trouvé le même diamètre d'inhibition (9mm) avec l'extrait méthanolique de la partie aérienne d'*Artemisia campestris* vis-à-vis la souche *Staphylococcus aureus*. Ainsi, il a été montré par El Abed et al. (2014) et Naili et al. (2010) que l'extrait méthanolique des feuilles d'*Artemisia campestris* a induit un effet antimicrobien significatif contre un large éventail de bactéries telles : *Escherichia coli* (17 mm), *Bacillus cereus* (25mm), *Staphylococcus aureus* (20mm), *Salmonella typhi* (13 mm) et *Pseudomonas aeruginosa* (9mm).

En outre, les huiles essentielles de la plante ont démontré une large amplitude du pouvoir antibactérien vis-à-vis : *Escherichia coli* (29 mm), *Pseudomonas aeruginosa* (18mm) et *Staphylococcus aureus* (25mm) [(Akrouit et al., 2007) ; (Baykan Erel et al., 2012) ; (Boutemak et al., 2016)] ce qui était complètement l'opposé de nos résultats, et cela peut être expliqué par les conditions et le mois de récolte de la plante.

Il a été rapporté par **Megdiche-Ksouri et ses collaborateurs (2015)** que les *Candida albicans* traitées par l'extrait aqueux ont induits une zone d'inhibition de 7mm, qui était assez similaire à notre étude.

Cependant, une zone d'inhibition allant de 7 à 9 mm a été observée suite au traitement des colonies de *Candida albicans* avec l'extraits méthanolique de la partie aérienne d'*Artemisia campestris*.

5.2.3. Détermination des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides ou fongicides de la plante *Artemisia campestris* :

Afin de déterminer la concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et La concentration Minimale Bactéricide (CMB) ou fongicide (CMF) des extraits d'*Artemisia campestris*, la méthode des microdilutions sur microplaque a été utilisée.

La concentration Minimale Inhibitrice (CMI) est définie comme étant la plus faible concentration de l'extrait capable d'inhiber toute croissance visible du germe. Elle mesure donc, un effet bactériostatique et ne renseigne pas sur l'état de la population bactérienne, ne permettent notamment pas de préciser si elle a été tuée en partie ou totalement ou si elle a seulement cessé de se multiplier

La concentration Minimale Bactéricide (CMB) ou fongicide (CMF) correspondant à la plus faible concentration en extrait capable de tuer 99,9% de l'inoculum bactérien initial (**Bergogne et al., 1999**).

Les résultats obtenus des valeurs de CMI et CMB et le facteur CMI/CMB sont présentés dans le **tableau 20**, ces résultats nous ont montré que les extraits d'*Artemisia campestris* possèdent un pouvoir inhibiteur sur les bactéries.

Tableau 20 : résultats obtenus de la CMI et la CMB et le facteur CMB/CMI

	GRAM(+)									GRAM(-)								
	<i>S.aureus</i>			<i>B.cerreus</i>			<i>L.monocytogenes</i>			<i>E.coli</i>			<i>P.aeruginosa</i>			<i>S.typhimurium</i>		
	CMB	CMI	CMB/ CMI	CMB	CMI	CMB/ CMI	CMB	CMI	CMB/ CMI	CMB	CMI	CMB/ CMI	CMB	CMI	CMB/ CMI	CMB	CMI	CMB/ CMI
HE	0.78	0.39	2	ID	ID	ID	12.5	6.25	2	12.5	6.25	2	ID	ID	ID	25	12.5	2
MeOh	1.56	0.39	4	25	12.5	2	25	12.5	2	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID
HEX	1.56	0.78	2	ID	ID	ID	1.56	0.78	2	20	12.5	2	ID	ID	ID	ID	ID	ID
Aq	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID

Résultats et discussion

D'après les résultats du tableau 20 nous avons remarqué que la concentration minimale inhibitrice des huiles essentielles est de 0,39 mg /ml vis-à-vis *S. aureus* ATCC 25923, avec une CMB de 0,78mg/ml. Cependant, une CMI de 6,25 mg/ml et une CMB de 12,5 mg/ml ont été enregistrées vis-à-vis *E. coli* ATCC 25922.

La CMI obtenue pour l'extrait méthanolique est de 0,39 mg/ml vis-à-vis la souche *S. aureus* ATCC 25923 et de concentration 12,5 mg/ml pour *L. monocytogenes* ATCC 19115 et *E. coli* ATCC 25922 avec facteur CMI/CMB 0,78 mg/ml. L'extrait hexanique a marqué une CMI 0,78 mg /ml pour *S. aureus* ATCC 25923 et *L. monocytogenes* ATCC 19115 et une CMB de 1,56 mg/ml, avec une absence totale de turbidité pour l'extrait aqueux.

Tous les extraits d'*Artemisia campestris* sauf l'extrait aqueux ont révélé une activité antibactérienne vis-à-vis toutes les souches bactériennes de gram positif mais avec des degrés différents ce qui s'est traduit par la différence des CMI, toutefois, la souche *P. aeruginosa* ATCC 27853 n'a montré aucune sensibilité pour ces extraits.

Le **tableau 21** représente les CMI, CMF et le facteur CMF/CMI des levures (*Candida albicans*) testées.

Tableau 21 : Concentration minimal inhibitrice (CMI), concentration minimal fongicide (CMF) et le rapport (CMF/CMI) vis-à-vis les *Candida albicans*

		Levures								
		CMF,CMI(mg /ML)								
		<i>Candida albicans</i> ATTC19115			<i>Candida albicans</i> ATTC IP444			<i>Candida albicans</i> ATCC 131		
Extraits	HE	CMF	CMI	CMF/CMI	CMF	CMI	CMF/CMI	CMF	CMI	CMF/CMI
		25	12.5	2	3.125	1.56	2.003	25	12.5	2
	Me OH		12.5	2	25	12.5	2	ID	ID	ID
	Hex	ID	ID	ID	25	12.5	2	ID	ID	ID
Aq	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	

La concentration minimale inhibitrice et la concentration minimale fongicide des huiles essentielles et celles d'extrait méthanolique sont déterminées à 12,5 mg/ml ; 25 mg/ml avec un rapport de CMI/CMF de 2 mg/ml vis-à-vis *Candida albicans* ATTC19115, l'extrait hexanique a enregistré la même concentration vis-à-vis *Candida albicans* ATTC IP444, avec une absence de croissance de l'extrait aqueux.

Les plantes contiennent de nombreux composés doués d'une action antimicrobienne, ces constituants comprennent les composés phénoliques, les flavonoïdes, les huiles essentielles et les triterpénoïdes (Rojas et al., 1992). Donc nous avons conclu que le pouvoir antimicrobien des extraits de plantes peut être lié à leurs compositions chimiques.

L'étude de Houicher et al., (2016) a enregistré que *Listeria monocytogenes* a été effectivement inhibée à une CMI de 6,25 mg/ml, alors que la concentration 12,5mg/ml était suffisante pour inhiber la croissance de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, Autrement, *Staphylococcus aureus* a été sensible à cet extrait à la CMI la plus élevée de 25 mg/ml.

6. Effet de l'extrait d'*Artemisia campestris* vis-à-vis les souches bactériennes :

Lorsque nous parlons d'activité antimicrobienne, on distingue deux sortes d'effets: une activité létale ou bactéricide et une inhibition de la croissance ou activité bactériostatique. Le plus souvent l'action des extraits des plantes médicinales sont assimilés à un effet bactériostatique. Cependant, certains de leurs constituants chimiques semblent avoir des propriétés bactéricides (Buert, 2004).

D'après les résultats de l'activité antimicrobienne obtenus par les tests de diffusion des disques, la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB), nous avons confirmé que la plante *Artemisia campestris* a un effet antimicrobien notamment l'extrait méthanolique.

Cet effet a été observé vis-à-vis la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, qui a montré une sensibilité décrite en **tableau 22**, c'est pour cela, cette dernière a été sélectionnée pour poursuivre notre étude qui consiste à déterminer les mécanismes d'action de la plante *Artemisia campestris* à l'égard de cette souche.

Tableau 22: Résultats des tests de l'activité antibactérienne d'*Artemisia campestris* vis-à-vis *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

	CMI/2	CMI	CMB	CMB x2	CMB/CMI
Concentrations (mg/ml)	0,097	0,39	1,56	6,25	1,17

Afin de réaliser cette étude, nous avons étudié l'effet de l'extrait méthanolique sur la viabilité cellulaire des cellules de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 pendant un intervalle de temps, la tolérance au sel et l'activité de lipases de la souche sur des milieux de cultures spécifiques.

6.1. Test de la viabilité cellulaire :

L'effet de l'extrait méthanolique d'*Artemisia campestris* vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a été évalué par la mesure de la réduction de nombre UFC par millilitre pendant 90 minutes, dont les résultats sont indiqués dans **Figure 32**.

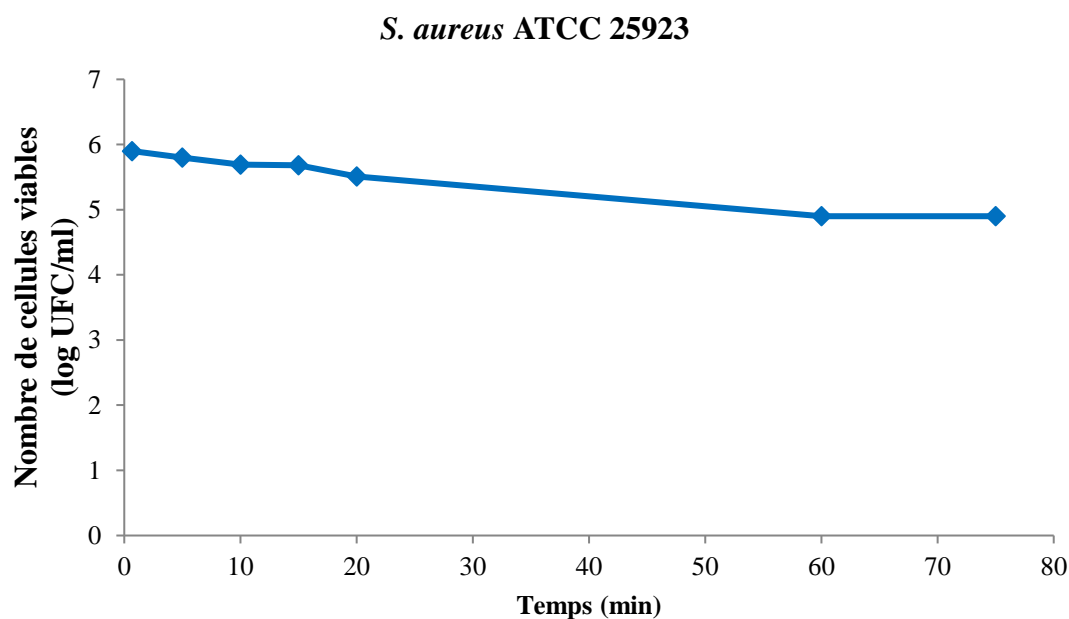


Figure 32 : Effet de l'extrait méthanolique d'*Artemisia campestris* à la CMB sur la viabilité cellulaire chez *S. aureus* ATCC 25923 pendant 75 minutes

Après le traitement de la souche *S. aureus* ATCC 25923 par l'extrait méthanolique à concentration 1,56 g/ml nous avons remarqué une réduction de 5 log₁₀ de la viabilité de la souche après 80 minutes d'incubation, avec un nombre de colonies limité et plus faible que celui du témoin.

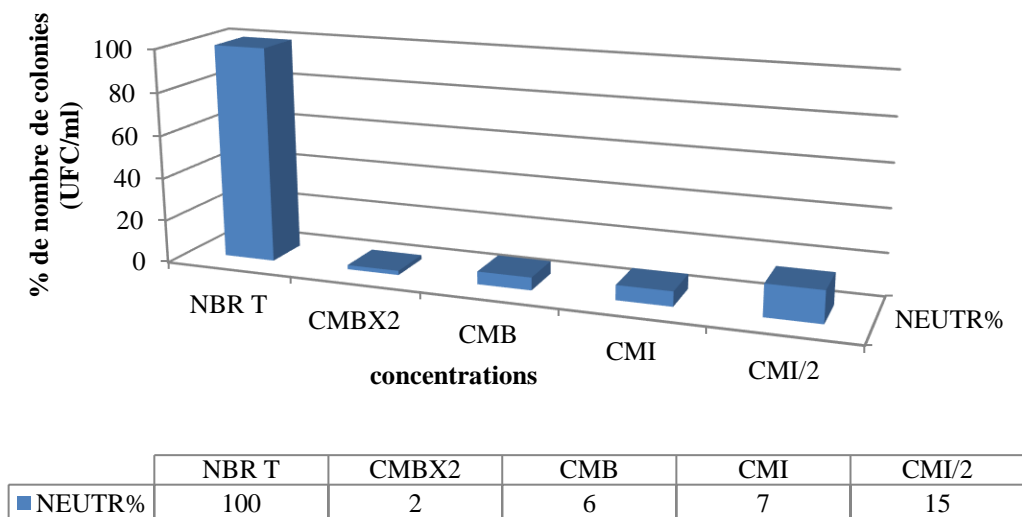


Figure 33 : histogramme représente les résultats de test de la viabilité cellulaire de tolérance au sel à différentes concentrations d'extrait méthanolique d'*Artemisia campestris* vis-à-vis les cellules de *staphylococcus aureus* en milieu neutralisateur.

Les résultats obtenus par cette étude montrent que les concentrations CMBx2, CMB, CMI, CMI/2 avait un effet très fort, qui a inhibé la viabilité des cellules de souche *S. aureus* ATCC 25923.

6.2. Test de tolérance au sel :

Les résultats de test de tolérance au sel des cellules de *S. aureus* ATCC 25923 après l'exposition à l'extrait méthanolique d'*Artemisia campestris* à différentes concentrations ; CMI/2, CMI, CMB, CMBx2, sont présentés dans la **figure 34**.

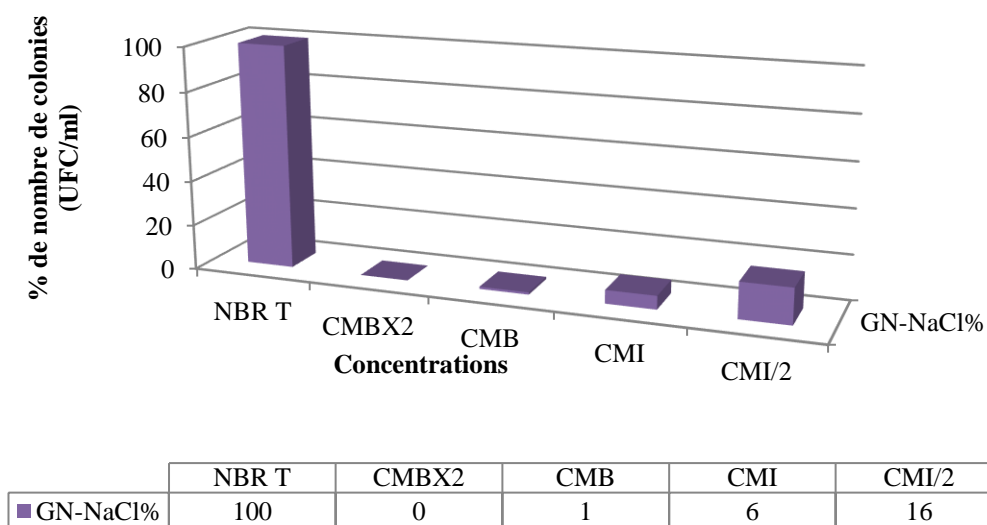


Figure 34 : histogramme représente les résultats de test de tolérance au sel à différentes concentrations d'extrait méthanolique d'*Artemisia campestris* vis-à-vis les cellules de *Staphylococcus aureus* en milieu GN-NaCl

Après le dénombrement des colonies de *S. aureus* ATCC 25923 sur GN-NaCl après 24h d'incubation à 37C, nous avons constaté que l'addition de l'extrait méthanolique a clairement réduit la capacité des cellules de *S. aureus* ATCC 25923 traitées à former des colonies.

Un traitement avec 6,5 mg/ml avait le potentiel d'éliminer, totalement, la capacité des cellules de *S. aureus* à former des colonies sur GN-NaCl. La concentration minimale bactéricide (1,56 mg/ml) a également réduit la capacité à former des colonies sur GN-NaCl, dans une mesure estimée de 1%.

6.3. Test d'activité de lipases :

L'effet de l'extrait méthanolique de la plante *Artemisia campestris* sur l'activité de lipases de *S. aureus* ATCC 25923 est représenté dans la **figure 35**.

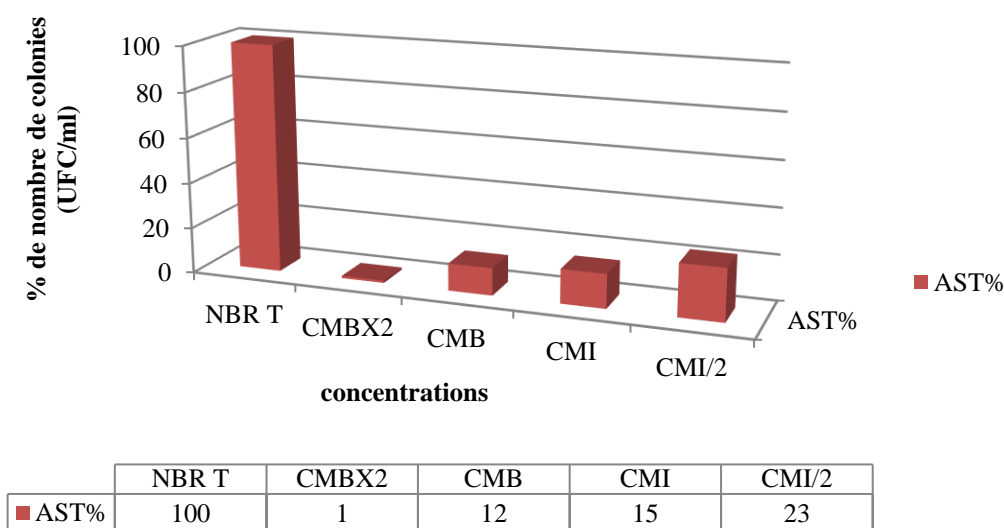


Figure 35 : Histogramme représente les résultats de test de l'activité de lipase à différentes concentrations d'extrait méthanolique d'*Artemisia campestris* vis-à-vis les cellules de *Staphylococcus aureus* en milieu AST

La proportion de cellules de *S. aureus* ATCC 25923 présentant des colonies d'activité lipase négative après exposition à des concentrations différentes d'extrait méthanolique présentée dans la figure a montré un effet de cet extrait sur l'activité de *S. aureus* ATCC 25923.

L'incubation des cultures avec des concentrations différentes d'extrait méthanolique d'*Artemisia campestris* a exercé une inhibition nette de l'activité lipase.

L'extrait méthanolique à la concentration 6,25 mg/ml a induit une inhibition de l'activité de lipase avec une valeur de 1%, et avec la décroissance des concentrations nous avons obtenu une croissance de nombre de colonie.

Les résultats obtenus par cette étude montrent le potentiel biologique élevé d'extrait méthanolique de la plante *Artemisia campestris*, en particulier l'antibactérien, spécifiquement contre la souche *Staphylococcus aureus*.

L'extrait méthanolique étudiée a fourni un effet inhibiteur intéressant de la viabilité cellulaire de *S. aureus* en intervalle de temps de 0 minutes à 80 minutes. La courbe de la viabilité cellulaire a également montré une relation claire entre le taux d'inhibition, la concentration de l'extrait et la durée d'exposition.

La perte de tolérance au sel pourrait révéler des dommages à la membrane dans les cellules de *S. aureus* ATCC 25923 causées par l'extrait méthanolique de la plante *Artemisia campestris*, **Carson et ses collaborateurs, (2002)** a expliqué ce résultat par la lésion létale de la membrane cellulaire microbienne provoquée par les concentrations des composés antimicrobiens peut altérer leur perméabilité et affecter l'aptitude de la membrane à osmoréguler correctement la cellule.

Nos résultats s'accordent avec ceux de **Carneiro de Barros et al., (2009)** qui ont étudié l'interférence des huiles essentielles de la plante *Origanum vulgare L* sur la souche *Staphylococcus aureus* qui a enregistré une réduction dans la viabilité cellulaire de cette souche.

7. Résultats de test de la cytotoxicité des extrait d'*Artemisia campestris* vis-à-vis les érythrocytes :

À fin d'étudier la cytotoxicité des extraits d'*Artemisia campestris* sur les globules rouges humains (GRH), nous avons réalisé un test de cytotoxicité in vitro par mettre les GRH en contact avec les extraits de la partie aérienne d'*Artemisia campestris* à différentes concentrations choisies selon les concentrations minimales inhibitrices (CMI) obtenues précédemment. Nos résultats sont exprimés en pourcentage d'hémolyse fonction du temps. Le taux d'hémolyse induit par les huiles essentielles d'*Artemisia campestris* est présenté dans la **figure 36**.

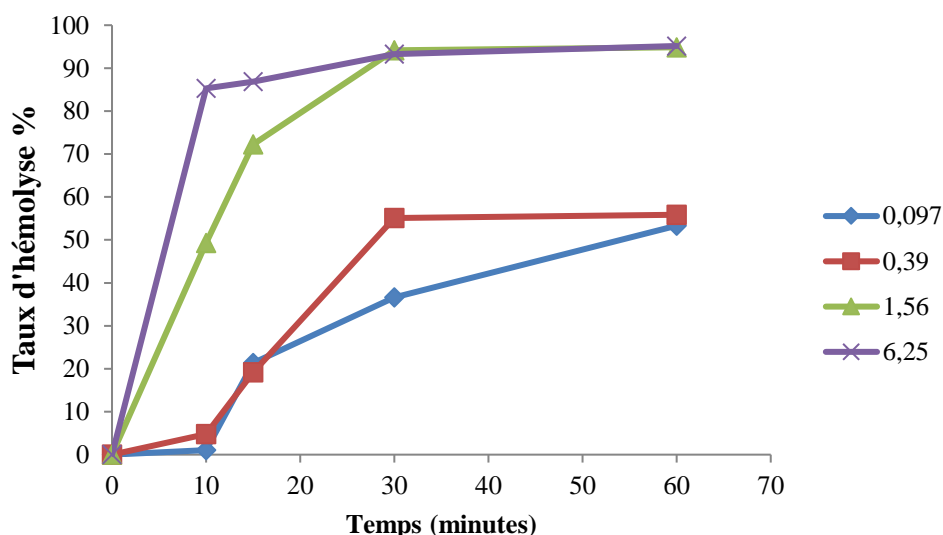


Figure 36: Taux d'hémolyse induit par les huiles essentielles d'*Artemisia campestris*

Les résultats obtenus de test de la cytotoxicité des huiles essentielles de la partie aérienne d'*Artemisia campestris* vis-à-vis les globules rouges humains (**figure 36**) ont enregistré une faible activité qui ne dépasse pas 10% de taux d'hémolyse pour les deux concentrations 0,097 mg/ml et 0,39 mg/ml dans les premières 10 minutes, tandis que les concentrations 1,56 mg/ml et 6,25 mg/ml ont un effet hémolytique significatif dès le temps t=0 minutes, avec un pourcentage qui dépasse 70%, le taux d'hémolyse maximale est marqué par la concentration 6,25mg/ml avec un pourcentage de 95,16%. La **Figure 37** montre le taux d'hémolyse induit par l'extrait méthanolique d'*Artemisia campestris*

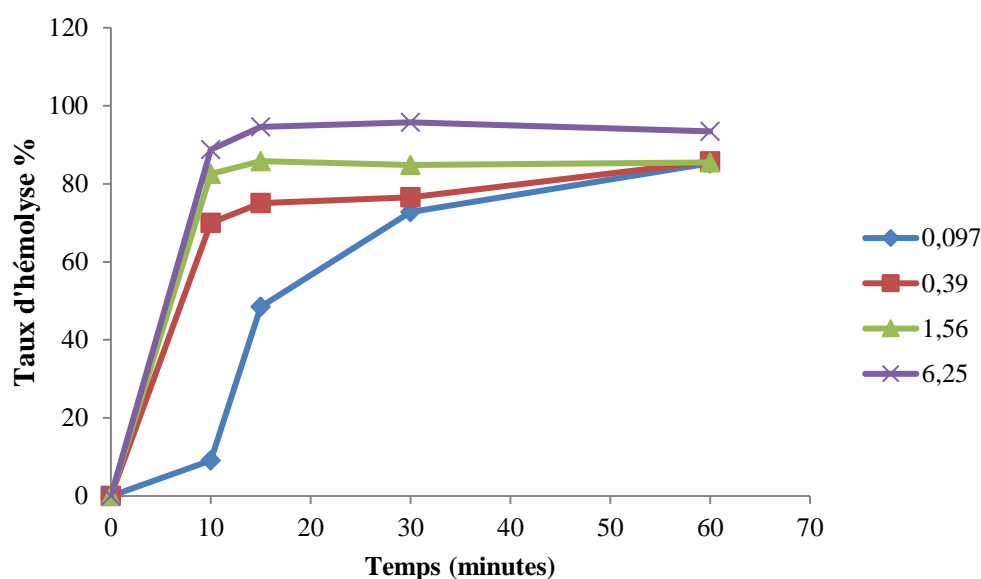


Figure 37: Taux d'hémolyse induit par l'extrait méthanolique d'*Artemisia campestris*

D'après la **figure 37**, nous avons constaté que les concentrations 0,39 mg/ml, 1,56 mg/ml et 6,25 mg/ml provoquent une hémolyse avec un taux très élevé dès le premier contact t=0 minutes, ensuite, se stabilisent après environ 15 minutes d'incubation. En revanche, la concentration 0,097 mg/ml qui est faiblement cytotoxique en t=0 mais atteint une évolution cytotoxique au cours du temps d'incubation.

L'hémolyse maximale (95,76%) est obtenue avec l'extrait méthanolique à la concentration 6,25 mg/ml. Cet extrait à 6,25 mg/ml est considéré comme étant le plus toxique vis-à-vis des globules rouges.

La figure 38 présente le taux d'hémolyse induit par l'extrait aqueux d'*Artemisia campestris*

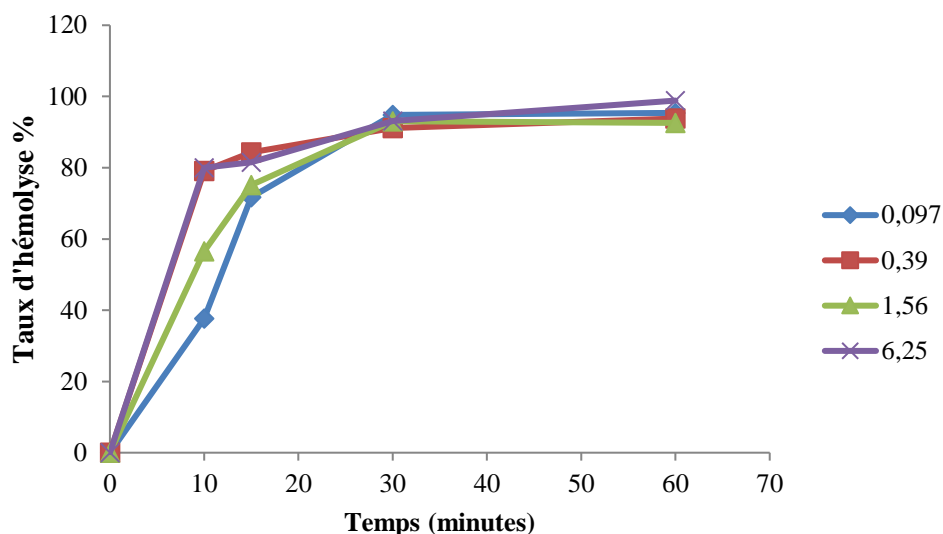


Figure 38 : Taux d'hémolyse induit par l'extrait aqueux d'*Artemisia campestris*

Nous remarquons dans la figure **figure 38** que l'extrait aqueux de la plante *Artemisia campestris* présente un effet hémolytique directement proportionnels à l'augmentation des concentrations des extraits en fonction du temps et qui se stabilise après 30 minutes d'incubation et le taux d'hémolyse des concentrations se varient entre 94% et 99%.

L'utilisation des plantes médicinales est en croissance partout dans le monde, mais certaines plantes utilisées à visée thérapeutique peuvent à fortes doses, présenter une menace pour la santé humaine (**Zakariya et coll, 2012**) pour cela, il est nécessaire d'identifier la partie de la plante utilisable et évaluer sa toxicité (**Fourasté, 2000**).

L'étude de cytotoxicité d'*Artemisia campestris* nous a clairement montré que la plante avait pratiquement une activité cytotoxique vis-à-vis les globules rouges humain (**tableau 23**).

Tableau 23 : taux d'hémolyse des extraits de la plante *Artemisia campestris*

	Taux d'hémolyse maximale (%)	Concentration correspondante
Huiles essentielles	95,16	6,25 mg/ml
Extrait méthanolique	95,76	6,25 mg/ml
Extrait aqueux	98,85	6,25 mg/ml

Résultats et discussion

Ces résultats sont expliqués par la présence flavonoïdes, les saponines et les alcaloïdes qui sont décrits dans la littérature comme possédant une forte activité cytotoxique prouvée (**Petit et coll, 1991**), dans nos extraits notamment l'extrait aqueux.

Dans une étude réalisée sur l'effet d'*Artemisia annua L.* qui appartient au même genre de notre plante, **Zime-Diawara et al., (2015)** ont montré que l'infusion de cette plante entraîne une hémolyse puis augmentation en taux des hémoglobines.

Conclusion générale

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

Dans le présent travail nous avons étudié quelques propriétés phytochimiques, les activités biologiques des extraits d'*Artemisia campestris* ainsi que sa cytotoxicité vis-à-vis les érythrocytes et ses mécanismes d'action à l'égard des souches bactériennes.

L'extraction de la partie aérienne de la plante *Artemisia campestris* récoltée des régions d'Ain El Hdjar (Saida) a permis d'obtenir des rendements qui diffèrent en fonction des solvants utilisés. Alors que, l'extrait aqueux était le plus fort à (9,21%) suivi par l'extrait méthanolique à (7,37 %), Hexanique à (6,12 %) et les huiles essentielles avait un rendement de (1,25%).

Le screening phytochimique a mis en évidence la présence des métabolites secondaires tel que alcaloïdes, coumarines, stérols et tri-terpènes coumarines, quinones, tanins et saponines pour l'extrait méthanolique et aqueux avec l'absence de ces composés en extrait Hexanique.

L'évaluation de l'activité antioxydante des différents extraits d'*Artemisia campestris* a montré que l'extrait aqueux a une forte activité anti radicalaire par rapport le témoin utilisé (acide ascorbique) avec une IC_{50} de l'ordre de 0,49mg /ml. La capacité antioxydante total la plus élevée a été observée avec les extraits les plus polaires suit à la concentration de 500mg/m l'extrait aqueux avait un pouvoir antioxydant le plus élevé (26,24mg EAG/g MS) par rapport à l'extrait méthanolique (13,81mg/g MS).

L'ensemble de nos résultats montre que le traitement des espèces fongiques testées par les extraits d'*Artemisia campestris* avait un effet antifongique. Principalement, sur *Endosporium spp* avec un indice d'inhibition de 65% par l'extrait méthanolique, ce qui le rend cette souche la plus sensible des souches étudiées. Cependant, la souche *Aspergillus niger* était la souche la plus résistante vis-à-vis des deux extraits testés avec un indice de 4% et 8% à des faibles concentrations.

Conclusion et perspectives

Au vu de nos résultats de l'activité antimicrobienne de la plante *Artemisia campestris* sur six souches bactériennes et trois levures par la méthode de diffusion sur gélose l'effet de cette plante a été définie sur la souche *Staphylococcus aureus* ATTC 25923 qui a montré une sensibilité vis-à-vis tous les extraits, également vis-à-vis de *Bacillus cereus* ATCC 11778 avec une zone de 18,5 mm par l'extrait méthanolique qui est considéré comme l'extrait le plus actif vis-à-vis les souches bactériennes. Par contre, les huiles essentielles avaient une activité puissante envers les *Candida albicans* avec une zone de 15 mm.

L'extrait aqueux n'a enregistré aucune activité vis-à-vis les souches et une faible activité contre les levures utilisées.

Les CMI et CMB (CMF) ont été déterminées, par la méthode de micro-dilution, pour les quatre extraits (Aqueux ; Méthanolique ; Hexanique ; Huiles essentielles) de la plante ayant montré un effet inhibiteur notable contre les souches utilisées. Le rapport (CMB/CMI) ; (CMF/CMI) des différents extraits actifs vis-à-vis des souches, particulièrement *Staphylococcus aureus* qui est fortement sensible aux concentrations 0,39 mg/ml, 0,59 mg/ml et 0,78 mg/ml.

L'extrait méthanolique sur la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a fourni un effet inhibiteur intéressant sur la viabilité cellulaire de cette souche, ainsi que sa tolérance au sel et son activité de lipase qui a enregistré une inhibition de 0% de croissance.

L'étude de la cytotoxicité de la plante *Artemisia campestris* nous a clairement montré que la plante avait une activité cytotoxique vis-à-vis les globules rouges humain avec un taux d'hémolyse atteint 98,85% en extrait aqueux qui est considéré comme le plus cytotoxique des extraits étudiés.

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

L'ensemble de ces résultats obtenus ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances d'origine naturelle biologiquement active, et donc il est nécessaire de compléter ce travail par des études supplémentaires approfondies.

Conclusion et perspectives

Enfin, nous recommandons une culture des plantes médicinales pour permettre à la population d'avoir des médicaments et des denrées alimentaires moins chers et plus naturels et d'éviter la disparition de certaines espèces intéressantes.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Agence française de sécurité sanitaire. (2008). Contribution pour l'évaluation de la sécurité des produits cosmétiques contenant des huiles essentielles.

Akrouf, A., Chemli, R., Chreïf, I., & Hammami, M. (2001). Analysis of the essential oil of *Artemisia campestris* L. *Flavour and fragrance journal*, 16(5), 337-339.

Akrouf, A., El Jani, H., Amouri, S., & Neffati, M. (2010). Screening of antiradical and antibacterial activities of essential oils of *Artemisia campestris* L., *Artemisia herba alba* Asso, & *Thymus capitatus* Hoff. et Link. growing wild in the Southern of Tunisia. *Recent Research in Science and Technology*, 2(1).

Akrouf, A., Gonzalez, L. A., El Jani, H., & Madrid, P. C. (2011). Antioxidant and antitumor activities of *Artemisia campestris* and *Thymelaea hirsuta* from southern Tunisia. *Food and Chemical Toxicology*, 49(2), 342-347.

Akrouf, A., Mighri, H., Krid, M., Thabet, F., Turki, H., El-Jani, H., & Neffati, M. (2012). Chemical composition and antioxidant activity of aqueous extracts of some wild medicinal plants in southern Tunisia. *International Journal of Life Science and Medical Science*, 2(1), 1-4.

Akrouf, A., Neftati, M., Chemli, R., Aouni, M. (2007). Composition chimique et activités biologiques de l'huile essentielle d'*Artemisia campestris* L. *Revue des régions arides*, 231-240.

Allion, A., Baron, J. P., & Boulange-Petermann, L. (2008). Impact of surface energy and roughness on cell distribution and viability. *Biofouling*, 22(5), 269-278.

Al-Snafi, A. E. (2015). Encyclopedia of the constituents and pharmacological effects of Iraqi medicinal plants. Rigi Publication.

Aniya, Y., Shimabukuro, M., Shimoji, M., Kohatsu, M., Gyamfi, M. A., Miyagi, C., ... & Egashira, T. (2000). Antioxidant and hepatoprotective actions of the medicinal herb *Artemisia campestris* from the Okinawa Islands. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 23(3), 309-312.

Arabi, A. (2018). Effet antimicrobien des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus* L. sur quelques espèces bactériennes multirésistantes de la microflore digestive humaine.

Bahrami, A., Corradini, C., Over, D. J., & Yazdi, M. (2013). Conodont biostratigraphy of the upper Frasnian-lower Famennian transitional deposits in the Shotori Range, Tabas area, Central-East Iran Microplate.

Bakchiche, B., & Gherib, A. (2014). Activités antioxydantes des polyphénols extraits de plantes médicinales de la pharmacopée traditionnelle d'Algérie [Antioxidant activities of polyphenol extracts from medicinal plants in Algerian traditional pharmacopoeia]. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 9(1), 167.

Bammou, M., Daoudi, A., Sellam, K., ElRhaffari, L., Ibijbijen, J., & Nassiri, L. (2015). Étude

Ethnobotanique des Astéracées dans la Région Meknès-Tafilalet (Maroc)/[Ethnobotanical Survey of Asteraceae Family used in Meknes-Tafilalet Region (Morocco)]. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 13(4), 789.

Baratta, M. T., Dorman, H. D., Deans, S. G., Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., & Ruberto, G. (1998). Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flavour and fragrance journal*, 13(4), 235-244.

Bassene, E., Mahamat, B., Lo, M., Boye, C. S. B., & Faye, B. (1995). Comparaison de l'activité antibactérienne de trois Combretaceae: *Combretum micranthum*, *Guiera senegalensis* et *Terminalia avicennioides*. *Fitoterapia*, 66(1), 86-87.

Belhattab, R., Boudjouref, M., Barroso, J. G., Pedro, L. P., & Figueirido, A. C. (2011). Essential oil composition from *Artemisia campestris* grown in Algeria. *Advances in Environmental Biology*, 429-433.

Benarba, B. (2016). Medicinal plants used by traditional healers from South-West Algeria: An ethnobotanical study. *Journal of intercultural ethnopharmacology*, 5(4), 320.

Benarba, B., Belabid, L., Righi, K., amine Bekkar, A., Elouissi, M., Khaldi, A., & Hamimed, A. (2015). Ethnobotanical study of medicinal plants used by traditional healers in Mascara (North West of Algeria). *Journal of ethnopharmacology*, 175, 626-637.

Benchelah, A. C., Bouziane, H., & Maka, M. (2004). Fleurs du Sahara, arbres et arbustes, voyage au coeur de leurs usages avec les Touaregs du Tassili. *Phytothérapie*, 2(6), 191-197.

Benítez, G., González-Tejero, M. R., & Molero-Mesa, J. (2010). Pharmaceutical ethnobotany in the western part of Granada province (southern Spain): Ethnopharmacological synthesis. *Journal of Ethnopharmacology*, 129(1), 87-105.

Benn, J., Su, F., Doria, M., & Schneider, R. J. (1996). Hepatitis B virus HBx protein induces transcription factor AP-1 by activation of extracellular signal-regulated and c-Jun N-terminal mitogenactivated protein kinases. *Journal of Virology*, 70(8), 4978-4985.

Bennis, S., Chami, F., Chami, N., Bouchikhi, T., & Remmal, A. (2004). Surface alteration of

Saccharomyces cerevisiae induced by thymol and eugenol. *Letters in Applied Microbiology*, 38(6), 454-458.

Bezanger L., Pinkas M., and Torck M., (1975). Les plantes dans la thérapeutique moderne.

Böhme, K., Barros-Velázquez, J., Calo-Mata, P., & Aubourg, S. P. (2014). Antibacterial, antiviral and antifungal activity of essential oils: Mechanisms and applications. In *Antimicrobial Compounds* (pp. 51-81). Springer, Berlin, Heidelberg.

Bora, K. S., & Sharma, A. (2011). The genus *Artemisia*: a comprehensive review. *Pharmaceutical Biology*, 49(1), 101-109.

Bouchouka E. (2016). Extraction des polyphénols et étude des activités antioxydante et antibactérienne de quelques plantes Sahariennes. (Thèse de doctorat)

Boudjouref M. (2018). Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisiacampestris* L (Doctoral dissertation).

Boukhatem, M. N., Hamaidi, M. S., Saidi, F., & Hakim, Y. (2010). Extraction, composition et propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle du *Géranium Rosat* (*Pelargonium graveolens* L.) cultivé dans la plaine de Mitidja (Algérie). *Nature & Technology*, (3), 37.

Boulanouar, B., Abdelaziz, G., Aazza, S., Gago, C., & Miguel, M. G. (2013). Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils. *Industrial Crops and Products*, 46, 85-96.

Boumar, R., Brini, F., & Bouzerzour, H. (2014). Ethnobotanical study of medicinal plants in Djebel messaad region (M'sila, Algeria). *Global J Res. Med. Plants & Indigen. Med.* | Volume, 3(12), 445459.

Boutemak, K., Benali, N., & Moulai-Mostefa, N. (2016). Effect of Hemicellulase on Extraction of Essential Oil from Algerian *Artemisia campestris*. *International Journal of Chemical and Molecular Engineering*, 9(12), 1508-1511.

Braga, C. V. de P. ; Freire Fuentes, M. F. ; Freitas, E. R. ; de Carvalho, L. E. ; de Sousa, F. M. ;

Bastos, S. C., (2005). Effect of inclusion of coconut meal in diets for laying hens. *Rev. Bras. Zootec.*, 34 (1): 76-80

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.

Braz I. and Mohamed Hanchour. (2018). Etude phytochimique et activité antibactérienne de quatre plantes sahariennes (*Artemisa herba helba*, *Haloxylon scoparium*, *Peganum harmala* et *Zygophyllum album*)

Brouillard, R., & Dangles, O. (1994). The Flavonoids: advances in research since 1986. by Harborne JB, Chapman & Hall, London, 565-588.

Bruneton, J. (1993). Pharmacognosie: phytochimie plantes médicinales (No. 581.634 B7).

Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie, Phytochimie. Plantes médicinales. 3ème Ed Techniques et documentations. Paris. pp: 227-310-312-313-314.494.

Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.

- Burt, S. (2004).** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.
- Carson, C. F., Mee, B. J., & Riley, T. V. (2002).** Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(6), 1914-1920.
- Carvalho, I. S. D., Teixeira, M. C., & Brodelius, M. (2011).** Fatty acids profile of selected *Artemisia* spp. plants: Health promotion. *LWT-Food Science and Technology*, 44(1), 293-298.
- Chaberier J. Y., (2010).** Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie. Thèse de docteur d'Etat en pharmacie. Université H.P. Nancy1 France. P 173.
- Chalchat, J. C., Cabassu, P., Petrovic, S. D., Maksimovic, Z. A., & Gorunovic, M. S. (2003).** Composition of essential oil of *Artemisia campestris* L. from Serbia. *Journal of Essential Oil Research*, 15(4), 251-253.
- Chermat, S., & Gharzouli, R. (2015).** Ethnobotanical study of medicinal flora in the North East of Algeria-An empirical knowledge in Djebel Zdim (Setif). *J Mater Sci Eng*, 5, 50-9.
- Colin, M. E., de Lahitte, J. D., Larribau, E., & Boué, T. (1989).** Activité des huiles essentielles de Labiées sur *Ascophæra apis* et traitement d'un rucher. *Apidologie*, 20(3), 221-228.
- Cowan, M. M. (1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-582.
- Cronquist, A. (1963).** Manual of vascular plants of northeastern United States and adjacent Canada. Princeton, NJ; Toronto: Van Nostrand.
- De Barros, J. C., da Conceição, M. L., Neto, N. J. G., da Costa, A. C. V., Júnior, J. P. S., Junior, I. D. B., & de Souza, E. L. (2009).** Interference of *Origanum vulgare* L. essential oil on the growth and some physiological characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. *LWT Food Science and Technology*, 42(6), 1139-1143.
- Debuigne G. (1974).** Larousse des plantes qui guérissent, Ed. Larousse.
- Djidel, S., Khennouf, S., Baghiani, A., Harzallah, D., & Arrar, L. (2009).** Medicinal plants used traditionally in the Algerian folk medicine for gastrointestinal disorders and hypertension: total polyphenols, flavonoids and antioxidant activity. In XIII International Conference on Medicinal and Aromatic Plants 854 (pp. 59-65).
- Djoudi M. and Ghebrioua S. (2017).** Etude de l'activité antioxydante et anti-hémolytique des extraits de feuilles de citrus limon.

Dob, T., Dahmane, D., Berramdane, T., & Chelghoum, C. (2005). Chemical composition of the essential oil of *Artemisia campestris* L. from Algeria. *Pharmaceutical biology*, 43(6), 512-514.

Dong, Z., Ma, W. Y., Huang, C., & Yang, C. S. (1997). Inhibition of tumor promoter-induced activator protein 1 activation and cell transformation by tea polyphenols,(-)-epigallocatechin gallate, and theaflavins. *Cancer research*, 57(19), 4414-4419.

Douissa, F. B., Hayder, N., Chekir-Ghedira, L., Hammami, M., Ghedira, K., Mariotte, A. M., & Dijoux-Franca, M. G. (2005). New study of the essential oil from leaves of *Pistacia lentiscus* L.(Anacardiaceae) from Tunisia. *Flavour and fragrance journal*, 20(4), 410-414.

El Haib, A. (2011). Valorisation de terpènes naturels issus de plantes marocaines par transformations catalytiques (Doctoral dissertation, Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier).

Elbidi A. (2016). Screening phytochimique de quelques plantes steppiques *ArtemisiaCampestris* et *Teucrium Polium* de la région de El Hamel wilaya de M'Sila.

Elkolli M. (2016). Structure et activités des substances naturelles : principes et applications.

Elmouloud B. (2016). Extraction des polyphénols et étude des activités antioxydante et antibactérienne de quelques plantes Sahariennes. (Thèse de doctorat)

Essid, R., Rahali, F. Z., Msaada, K., Sghair, I., Hammami, M., Bouratbine, A., ... & Limam, F. (2015). Antileishmanial and cytotoxic potential of essential oils from medicinal plants in Northern Tunisia. *Industrial Crops and Products*, 77, 795-802.

Fouché J.G., A Marquet and Hambuckers A. (2002). Les plantes médicinales de la plante au médicament. Exposition temporaire du 19.09. au 30.06.2000.

Gazengel J.M., Orecchioni A.M. (2013). Le préparateur en pharmacie. Guide théorique et pratique. 2ème ed. Ed. Tec et Doc, Paris. France. P1443.

Ghestem, A., Seguin, E., Paris, M., & Orecchioni, A. M. (2008). Le préparateur en pharmacie, dossier 2, Botanique, Pharmacognosie, Phytothérapie. Homéopathie. Ed. TEC et DOC.

Gouveia, S. C., & Castilho, P. C. (2013). *Artemisia annua* L.: essential oil and acetone extract composition and antioxidant capacity. *Industrial Crops and Products*, 45, 170-181.

Grimaud, F. (2009). Les Astéracées du Ladakh dans la médecine tibétaine. *Phytothérapie*, 7(5), 255.

Guendouzen R. and Haddouche L. (2016). Extraction des métabolites secondaires (composés phénoliques et huiles essentielles) et évaluation de l'activité antioxydante chez l'espèce *Juniperus oxycedrus*.

- Guignard J.L.;Cosson L.and Henry H. (1995).** Abrégé de phytochimie ;Hasson. p 224.
- Guillouty, A. (2016).** Plantes médicinales et antioxydants(Doctoral dissertation).
- Guinoiseau, E. (2010).** Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles: séparation, identification et mode d'action (Doctoral dissertation).
- Harborne, A. J. (1998).** Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis. springer science & business media.
- Harborne, J. B., & Williams, C. A. (2000).** Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55(6), 481-504.
- HassaniM, E., Douiri, E. M., Bammi, J., Zidane, L., Badoc, A., & Douira, A. (2013).** Plantes médicinales de la Moyenne Moulouya (nord-est du Maroc). *Ethnopharmacologia*, 50, 39.
- Hellal, Z. (2011).** Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*) (Doctoral dissertation, Université Mouloud Mammeri).
- Hennebelle, T., Sahpaz, S., & Bailleul, F. (2004).** Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 2(1), 3-6.
- Hodré P. (2014).** Plantes médicinales, P : 1.
- Houicher, A., Kuley, E., Özogul, F., & Bendeddouche, B. (2015).** Effect of Natural Extracts (*M entha spicata* L. and *A rtemisia campestris*) on Biogenic Amine Formation of Sardine Vacuum-Packed and Refrigerated (*S ardina pilchardus*) Fillets. *Journal of food processing and preservation*, 39(6), 2393-2403.
- Hurabielle, M., Eberle, J., & Paris, M. (1982).** Etude des flavonoïdes d'*Artemisia campestris* sousespèce *glutinosa*. *Planta medica*, 46(10), 124-125.
- ISERIN P. (2001).** Larousse des plantes médicinales. Identification, préparation, Soins.Ed. Larousse, Paris. France. p335.
- Jamila, F., & Mostafa, E. (2014).** Ethnobotanical survey of medicinal plants used by people in Oriental Morocco to manage various ailments. *Journal of ethnopharmacology*, 154(1), 76-87.
- Jamila, F., & Mostafa, E. (2014).** Ethnobotanical survey of medicinal plants used by people in Oriental Morocco to manage various ailments. *Journal of ethnopharmacology*, 154(1), 76-87.
- Jaouadi, I., Abdelkafi-Koubaa, Z., Riabi-Ayari, S., Hassen, I., Yakoubi, M. T., Ayeb, M. E., ... & Marrakchi, N. (2016).** Anti-hemolytic and Anti-cytotoxic Effect of Two *Artemisia*

Species (*A. campestris* and *A. herba-alba*) Essential Oil against Snake Venom. *International Journal of Agriculture & Biology*, 18(4).

Jaouadi, I., Abdelkafi-Koubaa, Z., Riabi-Ayari, S., Hassen, I., Yakoubi, M. T., Ayeb, M. E., & Marrakchi, N. (2016). Anti-hemolytic and Anti-cytotoxic Effect of Two *Artemisia* Species (*A. campestris* and *A. herba-alba*) Essential Oil against Snake Venom. *International Journal of Agriculture & Biology*, 18(4).

Joulain, D., & Tabacchi, R. (1994). Two volatile β -chromenes from *Wisteria sinensis* flowers. *Phytochemistry*, 37(6), 1769-1770.

Judd W.S., Campbell C.S., Kellogg E.A. and Steven P. (2002). Botanique Systématique : une perspective phylogénétique. Ed 1: Deboeck. p: 84-336.

Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., & Stevens, P. (2002). Botanique systématique: une perspective phylogénétique. De Boeck Supérieur.

Kabera, J., Koumaglo, K. H., Ntezurubanza, L., Ingabire, M. G., & Kamagaju, L. (2005). Caractérisation des huiles essentielles d'*Hyptis spicigera* Lam., *Pluchea ovalis* (Pers.) DC. et *Laggera aurita* (LF) Benth. Ex. CB Clarke, plantes aromatiques tropicales. *Etudes rwandaises*, 10, 7-18.

Kalemba, D. A. A. K., & Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current medicinal chemistry*, 10(10), 813-829.

Kalemba, D. A. A. K., & Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current medicinal chemistry*, 10(10), 813-829.

Khanbabae K., and Ree T.R. (2001). Tannins: Classification and Defenition. *Journal of Royal Society of Chemistry*. 18: 641-649.

Khenaka K. (2011). Effet de diverses plantes médicinales et de leurs huiles essentielles sur la méthanogénèse ruminale chez l'ovin. Université Mentouri. Constantine. p81.

Kim, J. H., Kim, H. K., Jeon, S. B., Son, K. H., Kim, E. H., Kang, S. K., ... & Kwon, B. M. (2002).

New sesquiterpene–monoterpene lactone, artemisolide, isolated from *Artemisia argyi*. *Tetrahedron Letters*, 43(35), 6205-6208.

Lagunez Rivera L. (2006). Étude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffe par induction thermomagnétique directe. (Thèse de doctorat)

Lattab, A. (2018). Effet des composés naturels sur l'adhérence et la formation de biofilm à *Pseudomonas aeruginosa*. (Thèse de doctorat)

Lucchesi M. (2005). Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles. (Thèse de doctorat)

Mahadevan (1982). Biochemical aspects of plant disease resistance. Part I: Performed inhibitory substances. Today and Tomorrow Printers and Publisher.. New Delhi, India.. pp 425-431.

Makkar, H. P., Siddhuraju, P., & Becker, K. (2007). Plant secondary metabolites (pp. 101-106). Totowa, NJ, USA:: Humana Press.

Malne, J.F. Parve, M., Kam, A., Mckevy, A., Ahmed, I. and Bhatti, M. (1980). Journal of the Chemical Society. Pekin Transactions II, 1683.

Marc, F., Davin, A., Deglene-Benbrahim, L., Ferrand, C., Baccaunaud, M., & Fritsch, P. (2004).

Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. médecine/sciences, 20(4), 458-463.

Maurice N. (1997). De l'herboristerie d'autan à la phytothérapie moléculaire du XXI^e Siècle, Ed : Lavoisier, Paris, P 12-14.

McDonald, T., Gann, G., Jonson, J., & Dixon, K. (2016). International standards for the practice of ecological restoration—including principles and key concepts.(Society for Ecological Restoration: Washington, DC, USA.). Soil-Tec, Inc.,© Marcel Huijser, Bethanie Walder.

Megdiche-Ksouri, W., Trabelsi, N., Mkadmini, K., Bourgou, S., Noumi, A., Snoussi, M., and Ksouri, R. (2015). Artemisia campestris phenolic compounds have antioxidant and antimicrobial activity. Industrial Crops and Products, 63, 104-113.

Megdiche-Ksouri, W., Trabelsi, N., Mkadmini, K., Bourgou, S., Noumi, A., Snoussi, M., ... & Ksouri, R. (2015). Artemisia campestris phenolic compounds have antioxidant and antimicrobial activity. Industrial Crops and Products, 63, 104-113.

Mehrdad I, Seyed EA, Meysam MS. (2007). Detection of sesquiterpene lactones in ten Artemisia species population of Khorasan provinces. Iran J Basic Medi Sci, 10, 183–188

Moatti R., Fauron R., and Donadieu Y. (1983). La phytothérapie thérapeutique différente. Edition de LIBRAIRIE MALOINE S.A, Paris. P243.

Mohammedi, Z. (2013). Etude phytochimique et activités biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud Ouest de l'Algérie (Doctoral dissertation).

Natural resource conservation service, USA Dept. of Agriculture. (2002).

Nobis, M., Nowak, A., Nobis, A., Paszko, B., Piwowarczyk, R., Nowak, S., & Plášek, V. (2014). Contribution to the flora of Asian and European countries: new national and regional vascular plant records. Acta Botanica Gallica, 161(1), 81-89.

Nonaka, G. I., Nishioka, I., Nishizawa, M., Yamagishi, T., Kashiwada, Y., Dutschman, G. E., & Lee, K. H. (1990). Anti-AIDS agents, 2: inhibitory effect of tannins on HIV reverse transcriptase and HIV replication in H9 lymphocyte cells. *Journal of natural products*, 53(3), 587-595.

Norme AFNOR NF T 75-001 : Huiles essentielles - Règles générales concernant les caractéristiques des récipients destinés à contenir des huiles essentielles et recommandations pour leur conditionnement et leur stockage

Norme AFNOR NF T 75-002 Septembre (1996) : Huiles essentielles - Règles générales d'étiquetage et de marquage des récipients

O'Kennedy, R., and Thornes, R.D. (1997). Coumarins: Biology, Applications and Mode of Action. John Wiley & Sons Inc. New York. N.Y.

Ochocka, R. J., Rajzer, D., Kowalski, P., & Lamparczyk, H. (1995). Determination of coumarins from *Chrysanthemum segetum* L. by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 709(1), 197-202.

Ojala, T., Remes, S., Haansuu, P., Vuorela, H., Hiltunen, R., Haahtela, K., & Vuorela, P. (2000). Antimicrobial activity of some coumarin containing herbal plants growing in Finland. *Journal of ethnopharmacology*, 73(1-2), 299-305.

Ouahas C. (1996). Chimie Organique, Science biomédicales et Sciences de la nature. Office des publication Universitaires, Alger, 431.

Ouyahya, A. (1990). Clé de détermination des espèces marocaines du genre *Artemisia* L. *Al Biruniya Rev. Mar. Pharm.* 6(1), 31-91.

Paolini, V., Dorchie, P., & Hoste, H. (2003). Effets des tanins condensés et des plantes à tanins sur les strongyloses gastro-intestinales chez le mouton et la chèvre. *AlterAgri*, (61), 17-19.

Pecking A., Picandet, B., Hacene, K., Lokiec, F., & Guerin, P. (1987). Oligomères procyanidoliques(Endotelon®) et système lymphatique. *Artères et veines*, 6(6), 512-513.

Peterson, J., & Dwyer, J. (1998). Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. *Nutrition research*, 18(12), 1995-2018.

Prieto P, Pineda M, Aguilar M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E., *Anal Biochem*, 1;269(2):337-41.

Quezel, P., Santa, S., & Schotter, O. (1962). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales-v. 1-2.

Randriamiharisoa P. R., (1995). Manuel rapide et utile pour producteurs d'huiles essentielles.

- Rastogi, S. C., Johansen, J. D., Frosch, P., Menné, T., Bruze, M., Lepoittevin, J. P., ... & White, I. R. (1998).** Deodorants on the European market: quantitative chemical analysis of 21 fragrances. *Contact Dermatitis*, 38(1), 29-35.
- Rebbas, K., & Bounar, R. (2014).** Études floristique et ethnobotanique des plantes médicinales de la région de M'Sila (Algérie). *Phytothérapie*, 12(5), 284-291.
- Richter, G. (1993).** Métabolisme des végétaux: physiologie et biochimie.
- Romdhane, M., & Tizaoui, C. (2005).** The kinetic modelling of a steam distillation unit for the extraction of aniseed (*Pimpinella anisum*) essential oil. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 80(7), 759766.
- ROUMEISSA, L., and MAYA, L. (2015).** Comparaison de trois méthodes d'extraction des composés phénoliques et des flavonoïdes à partir de la plante médicinale: *Artemisia herba alba* Asso.
- Sarri, M., Boudjelal, A., Hendel, N., Sarri, D., & Benkhaled, A. (2015).** Flora and ethnobotany of medicinal plants in the southeast of the capital of Hodna (Algeria). *Arabian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 1(1), 24-30.
- Sassi, A. B., Harzallah-Skhiri, F., & Aouni, M. (2007).** Investigation of some medicinal plants from Tunisia for antimicrobial activities. *Pharmaceutical biology*, 45(5), 421-428.
- Scalbert, A. (1991).** Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30(12), 3875-3883.
- Schroeter, H., Boyd, C., Spencer, J. P., Williams, R. J., Cadenas, E., & Rice-Evans, C. (2002).** MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide. *Neurobiology of aging*, 23(5), 861-880.
- Sebaa, A. (2008).** Etude Phytochimique et Biologique d'*Ammodaucus leucotrichus*. Mémoire de Magister en Chimie Organique. Université d'Oran Es-Sénia.
- Seyoum, A., Asres, K., & El-Fiky, F. K. (2006).** Structure–radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry*, 67(18), 2058-2070.
- Shemluck, M. (1982).** Medicinal and other uses of the Compositae by Indians in the United States and Canada. *Journal of ethnopharmacology*, 5(3), 303-358.
- Sofowora, A. (2010).** Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique. KARTHALA Editions.
- Stahl-Biskup, E. (2002).** Essential oil chemistry of the genus *Thymus*—a global view. *Thyme: the genus Thymus*, 75-124.
- Subally, D., & Quézel, P. (2002).** Glacial or interglacial: *Artemisia*, a plant indicator with dual responses. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 120(1-2), 123-130.

Taguchi, G., Fujikawa, S., Yazawa, T., Kodaira, R., Hayashida, N., Shimosaka, M., & Okazaki, M. (2000). Scopoletin uptake from culture medium and accumulation in the vacuoles after conversion to scopolin in 2, 4-D-treated tobacco cells. *Plant science*, 151(2), 153-161.

Tammar, S., Sriti, J., Salem, N., Bachrouch, O., Rammami, M., Selmi, S., ... & Msaada, K. (2015). Regional effect on total lipids and fatty acid composition of some aromatic and medicinal plants growing wild in Tunisia. *RIVISTA ITALIANA DELLE SOSTANZE GRASSE*, 92(2), 113-122.

Tan, A. S., & Berridge, M. V. (2009). Differential effects of redox-cycling and arylating quinones on trans-plasma membrane electron transport. *BioFactors*, 34(3), 183-190.

Thomas, M. M. G., & Barbosa Filho, J. M. (1985). Anti-inflammatory actions of tannins isolated from the bark of *Anacardium occidentale* L. *Journal of ethnopharmacology*, 13(3), 289-30

Tlili, N., Elfalleh, W., Hannachi, H., Yahia, Y., Khaldi, A., Ferchichi, A., & Nasri, N. (2013). Screening of natural antioxidants from selected medicinal plants. *International journal of food properties*, 16(5), 1117-1126.

Volack J., Stodola J., (1983). *Les plantes médicinales*. Ed GRUND, paris.

Wang, X., Bo, J., Bridges, T., Dugan, K.D., Pan, T.C., Chodosh, L.A., Montell, D.J. (2006). Analysis of cell migration using whole-genome expression profiling of migratory cells in the *Drosophila* ovary. *Dev. Cell* 10(4): 483--495.

Watson, L. E., Bates, P. L., Evans, T. M., Unwin, M. M., & Estes, J. R. (2002). Molecular phylogeny of subtribe Artemisiinae (Asteraceae), including *Artemisia* and its allied and segregate genera. *BMC Evolutionary Biology*, 2(1), 17.

Ziyyat, A., Ramdani, N., Bouanani, N. E. H., Vanderpas, J., Hassani, B., Boutayeb, A. & Legssyer, A. (2014). Epidemiology of hypertension and its relationship with type 2 diabetes and obesity in eastern Morocco. *Springerplus*, 3(1), 644.

Annexes

Annexes

1. Compositions des milieux→ **Gélose nutritive**

Extrait de levure.....	02g
Extrait de viande.....	10g
Peptone.....	05g
Glucose.....	20g
NaCl	05g
Agar.....	17g
Eau distillée.....	1000ml
PH.....	7,4

→ **Sabouraud Agar**

Peptone.....	10g
Glucose.....	40g
Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000ml
PH.....	7

→ **Muller Hinton Agar**

Infusion de viande de bœuf.....	04g
Hydrolysate acide de caséine.....	17,5
Amidon.....	1,5g
Agar.....	17g
Eau distillée.....	1000ml
PH.....	6,8

→ **PDA (Potato Dextrose Agar)**

Extrait de pomme de terre.....	04g
Glucose.....	20g
Eau distillée.....	1000ml
PH.....	5,6

→ **Chapman**

Tryptone.....	05g
Peptone pepsique de viande.....	05g
Extrait de viande.....	01g
Mannitol.....	10g

Annexe

Chlorure de sodium.....	75g
Rouge de phénol.....	25
Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000g
pH.....	7,5

→ Hiktoen

Peptone.....	12g
Extrait de levure.....	03g
Charbonne de sodium.....	05g
Thiosulfate de sodium.....	05g
Sels biliaries.....	09g
Citrate de fer ammoniacal.....	1,5g
Silicone.....	02g
Lactose.....	12g
Saccharose.....	12g
Fuchsine acide.....	0,1g
Bleu de bromotymol.....	0,065g
Agar.....	13g
Eau distillée.....	1000ml
PH.....	7,4

→ King A

Gélatine peptone.....	20g/l
Magnesium chloride.....	1,4 g/l
Potassium sulfate.....	10g/l
Agar.....	10g/l
Eau distillée.....	1l
PH.....	7,2

→ King B

Mixed peptone.....	20g/l
Di potassium hydrogène.....	1,5 g/l
Magnesium Sulfate.....	1,5g/l
Agar.....	10g
Eau distillée.....	1l

Neutralisateur

Gélose nutritive.....	23g
NaCl.....	05g
Tween 80.....	05g
Jaune d'œuf.....	75g
Eau distillée.....	1000ml

→ **Agar Sulty tween (AST)**

Peptone	10g
NaCl.....	75g
CaCl ₂ H ₂ O.....	0,1 g
Tween 80.....	10g
Agar	20g
Eau distillée.....	1000ml

→ **GN-NaCl**

Gélose nutritif.....	23g
NaCl.....	50g
Tween 80.....	5g
Jaune d'œuf.....	75g
Eau distillée.....	1000ml

→ **Bouillon Sabouraud**

Peptone.....	10g
Glucose.....	40g
Eau distillée.....	1000ml
PH.....	7

→ **Bouillon Muller Hinton**

Infusion de viande de bœuf.....	02g
Hydrolysate acide de caséine.....	17.5g
Amidon.....	1.5g
Eau distillée.....	1000ml
PH.....	7.4

→ **Bouillon nutritif**

Extrait de levure.....	02g
Extrait de viande.....	10g

Peptone.....	05g
Glucose.....	20g
Nacl.....	05g
Eau distillée.....	1000ml

→ **Eau physiologique**

Nacl.....	09g
Eau distillée.....	1000 ml

→ **Eau peptonée**

Peptone.....	1g
Eau distillée.....	1000ml

2. Les colorants

→ **Violet de gentiane au cristal**

Violet de gentiane.....	10g
Phénol.....	20 g
Ethanol à 0,95.....	100ml
Eau distillée.....	1000ml

→ **Lugol**

Iode.....	05g
Iodure de potassium.....	10g
Eau distillée.....	01g

→ **Fushine de ziehl**

Fuchisine basique.....	10g
Phénol.....	50g
Ethanol à 0.5	100ml
Eau distillée.....	1000ml

3. Solutions

→ Solutions de la capacité antioxydante total

- a) 392,2 ml d'acide sulfurique dans 500 ml d'eau distillée
- b) 4,59 g phosphate de sodium dans 50 ml l'eau distillée
- c) 0,97 g molybdate d'ammonium dans 100ml l'eau distillée

Mélanger les trois solutions et ajuster à 1000 eau distillée

4. Résultats de test phytochimique de saponines

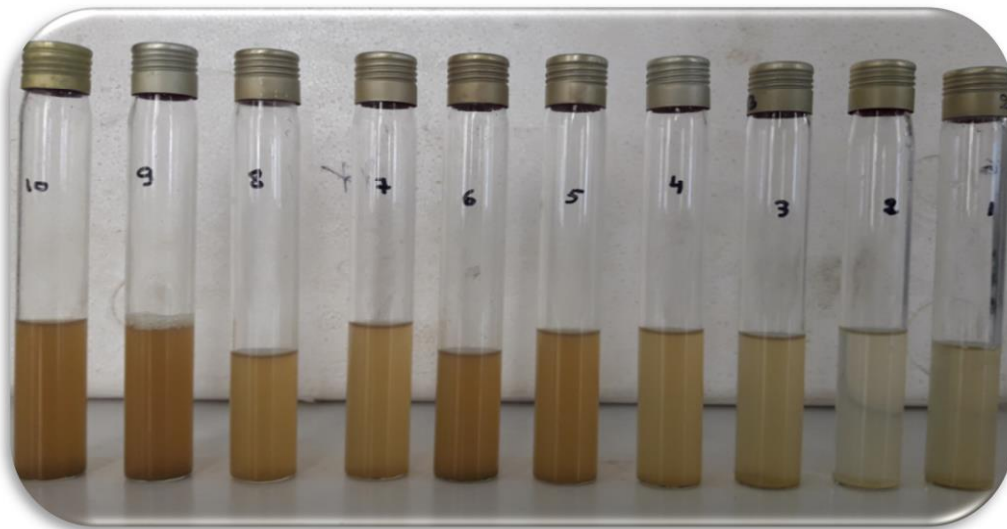


Figure 39 : résultat de test saponines d'extrait aqueux

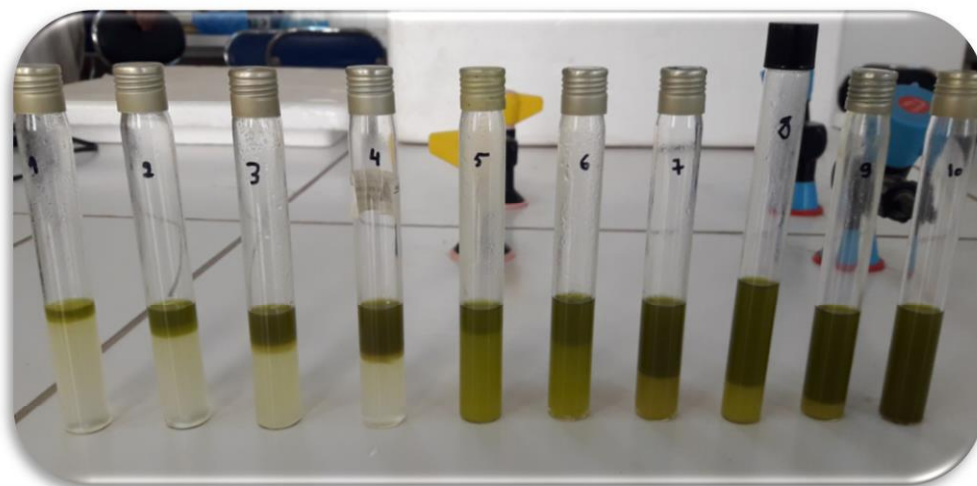


Figure 40 : résultat de test saponine d'extrait Hexanique



Figure 41 : résultat de test saponines d'extrait méthanolique