



Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie
Département des sciences de la nature et de la vie

MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie
Filière : Sciences biologiques
Spécialité : Microbiologie appliquée

Réf. :

Présenté et soutenu par :
Dalal MEHDI et Oumhani SALEM

Le : mardi 9 juillet 2019

Thème

Etude de l'activité antibactérienne d '*Artemisia herba alba* de la région (El-kantara) en vue de son utilisation comme bioconservateur dans le lait cru de vache

Jury :

Mme. Yamina BOUATROUS	MCA	Université de Biskra	Rapporteur
M. Fateh GUEMAZ	MAA	Université de Biskra	Président
M. Abdelouhab DEHIMAT	MAA	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2018 - 2019

Remerciements

Avant tout nous remercions Allah le tout puissant, de nous avoir guidé tout au long de nos années d'études et de nous avoir donné la volonté, la patience et le courage pour achever ce travail.

Nous tenons à exprimer nos remerciements les plus cordiaux et notre vive reconnaissance à notre encadreur, le Professeur Bouatrous Yamina qui a bien voulu accepter de diriger ce travail, pour son encouragement, ses conseils précieux, sa disponibilité, ses suggestions pertinentes, ses critiques constructives et pour sa patience tout au long de ce projet et sans lesquels, ce travail n'aurait pu aboutir.

Nous remercions les membres du jury, d'avoir accepté d'évaluer ce mémoire.

Nos vifs remerciements au Docteur Sara pour sa générosité et les nombreuses facilités qu'elle n'a cessé d'accorder ainsi que, son grand soutien pour l'accomplissement de ce travail.

Dédicace

Nous dédions notre travail à notre parent, qu'ils

Trouvent ici toute notre gratitude pour leur soutien

Tout au long de nos études.

A nos frères et nos sœurs.

A tous nos oncles et nos tantes

A tous notre cousins et cousines

Et n'oublier pas la femme qui nous a aidée;

Sara

A notre amies

Sommaire

Remerciements	
Dédicace	
Liste des Tableaux.....	I
Liste des Figures.....	II
Liste des abréviations.....	III
Introduction.....	1

Partie I : Synthèse bibliographique

Chapitre 1. Généralité sur la plante

1.1. <i>Artemisia herba alba</i>	3
1.1.1. Nomenclature.....	3
1.1.2. Description botanique.....	3
1.1.3. Distribution géographique.....	3
1.1.4. Classification.....	3
1.1.5. Utilisation traditionnelle de la plante.....	4
1.1.6. Activités biologiques.....	4
1.2. Les huiles essentielles.....	4
1.2.1. Définition.....	4
1.2.2. Répartition et localisation.....	4
1.2.3. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles.....	4
1.2.4. Composition chimique des huiles essentielles.....	5
1.2.4.1. Les composés terpéniques.....	5
a) Monoterpènes (C ₁₀ H ₁₆).....	5
b) Sesquiterpènes (C ₁₅ H ₈) ₃	5
1.2.4.2. Les composés aromatiques.....	5
1.2.5. Activité antibactérienne des huiles essentielles.....	5
1.3. Les polyphénols.....	6
1.3.1. Les flavonoïdes.....	6

1.3.1.1. Activité antibactérienne des flavonoïdes.....	6
--	---

Chapitre 2 . Le lait cru de vache

2.1. Le lait.....	7
2.1.1. Définition du lait cru	7
2.1.2. Composition chimique du lait de vache	7
2.1.3. Les caractéristiques physico-chimiques du lait	7
2.1.3.1. La densité	7
2.1.3.2. Le pH.....	7
2.1.3.3. L'acidité de titration ou acidité Dornic	8
2.1.3.4. Le point de congélation	8
2.1.4. Qualité organoleptique	8
2.1.5. Qualité microbiologique.....	8
2.1.5.1. La flore originelle.....	8
2.1.5.2. La flore de contamination	8
2.1.5.3. La flore pathogène.....	9
a) <i>Salmonelles</i>	9
b) <i>Staphylocoques</i>	9
2.1.6. Source de contamination du lait	9
2.1.6.1. Les composés chimiques	9
a) Antibiotiques	9
b) Pesticides.....	10
c) Métaux.....	10
2.1.6.2. Mauvaises Hygiène de la traite	10
2.1.7. Principales activités des microorganismes dans le lait	10
2.1.8. Conservation et réfrigération du lait cru	10
2.1.8.1. La réfrigération.....	10
2.1.8.2. Les conservateurs	10

Partie II : Etude expérimentale

Chapitre 3. Matériel et méthode

3.1. Matériel végétale	12
3.1.1. La récolte de la plante	12
3.1.2. Le séchage de la plante.....	12
3.2. Matériel microbien	12
3.3. Extraction des huiles essentielles	12
3.3.1. Conservation des huiles essentielles	13
3.3.2. Rendement de l'huile essentielle.....	13
3.4. Préparation des extraits d' <i>Artemisia herba alba</i>	13
3.4.1. Extrait brut éthanolique	13
3.4.2. Extrait aqueux	15
3.4.3. Rendements en extraits.....	15
3.5. Etude quantitative des métabolites des extraits d' <i>Artemisia herba alba</i>	15
3.5.1. Dosage des phénols totaux	15
3.5.2. Dosage des flavonoïdes	16
3.6. Evaluation de l'activité antibactérienne.....	17
3.6.1. Méthode de diffusion sur disque (aromatogramme)	17
3.6.2. Détermination de la Concentrations Minimales Inhibitrices.....	19
3.6.3. Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide.....	20
3.7. Utilisation des huiles dans le processus de la bio-conservation	21
3.7.1. Procédure d'échantillonnage	21
3.7.2. Préparation des huiles essentielles	21
3.7.3. Préparation des échantillons à conserver	21
3.8. Analyses du lait cru pendant la conservation	22
3.8.1. Analyse microbiologique du lait cru pendant la conservation	22
3.8.1.1. Préparation des dilutions décimales	22

3.8.1.2. Dénombrement de la flore totale mésophile (FTAM).....	22
3.8.1.3. Dénombrement des micro-organismes psychotrophes.....	23
3.8.1.4. Détermination du nombre UFC/ml	23
3.8.2. Analyses physico-chimiques	23
3.8.2.1. pH.....	24
3.8.2.2. Acidité titrable.....	24
Chapitre 4 . Résultats et discussions	
4.1. Extraction	25
4.2. Le rendement.....	25
4.3. Etude quantitative.....	27
4.3.1.Dosage des polyphénols totaux	27
4.3.2.Dosage des flavonoides	28
4.4. Etude du pouvoir antimicrobien des extraits d' <i>Artemisia herba alba</i>	29
4.4.1. Test de l'aromatogramme.....	29
4.4.2. Méthode de dilution en milieu liquide	31
4.4.2.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	31
4.4.2.2. Détermination de Concentration minimale bactéricide.....	32
4.5. Résultats de bio-conservation.....	33
4.5.1. Flore total	33
4.5.2. Bactéries Psychotrophes.....	34
4.5.3. pH.....	35
4.5.4. Acidité	35
Conclusion	37
Références bibliographiques	38
Annexes	
Résumé	

Liste des Tableaux

Tableau 1. Rendement des extraits d' <i>Artemisia herb alba</i>	25
Tableau 2. Dosage des polyphénols totaux.	27
Tableau 3. Dosage des flavonoïdes.	28
Tableau 4. Diamètre des zones d'inhibition de l'huile essentielle d' <i>Artemisia herba alba</i>	29
Tableau 5. Sensibilité des souches bactériennes de l'huile essentielle d' <i>Artemisia herba alba</i>	30
Tableau 6 . CMI des extraits d' <i>Artemisia herba alba</i>	31
Tableau 7. CMB des extraits d' <i>Artemisia herba alba</i>	32

Liste des Figures

Figure 1. <i>Artemisia herba alba</i>	12
Figure 2. Montage d'hydrodistillation de type clevenger.	13
Figure 3. Schéma représente les étapes de protocole appliqué pour l'extraction éthanolique.	14
Figure 4. Schéma représente les étapes de protocole appliqué pour l'extraction aqueux.....	15
Figure 5. Préparation de l'inoculum bactérien.....	18
Figure 6. Dépôts des disques imprégnés des extraits.	19
Figure 7. La méthode de micro-dilution en milieu liquide.	20
Figure 8. Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide.	21
Figure 9. Préparation des enchantions.....	22
Figure 10. Histogramme représente le rendement des différentes extraits d' <i>Artemisia herba alba</i>	26
Figure 11. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	27
Figure 12. Courbe d'étalonnage de la quercétine.	28
Figure 13. Observation aspect dans les puits de microplaque.....	31
Figure 14. Suivi de la survie de la flore total au cours du temps.	33
Figure 15. Suivi de la survie des bactéries psychrotrophes au cour du temps.	34
Figure 16. Suivi de l'évolution du pH au cours du temps.	35
Figure 17. Suivi de l'évolution du l'acidité au cours du temps.	36

Liste des abréviations

- **HE:** Huile essentielle.
- **MH:** Muller Hinton.
- **DMSO :** Diméthylsulfoxyde.
- **CMB :** Concentration Minimale Bactéricide.
- **CMI :** Concentration Minimale Inhibitrice.
- **ATTC :** American Type Culture Collection.
- **AFNOR :** Association Française de Normalisation.
- **FOA:** Food and Agriculture Organization.
- **PH :** Potentiel d'Hydrogène.
- **D° :** Degré Dornic.
- **OMS :** Organisation Mondiale de la Santé.
- **°C :** Degré Celsius.
- **FTAM :** Flore Totale Aérobie Mésophile.
- **UFC:** Unité Formant Colonie.
- **ATP :** Adénosine Tri Phosphate.
- **ADN :** Acide Désoxyribo Nucléique.
- **AW :** Activité de l'eau.
- **N :** Normalité.
- ***E .coli :*** *Escherichia coli*.
- ***S. aureus :*** *Staphylococcus aureus*.
- ***E.coli :*** *Escherichia coli*.
- ***P.aeroginsa :*** *Pseudomonas aeroginosa*.
- **CASFM :** Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.

Introduction

Introduction

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS, 2002), près de 80 % des populations dépendent de la médecine traditionnelle pour des soins de santé primaire. Des avantages économiques considérables dans le développement de cette médecine et dans l'utilisation des plantes médicinales pour le traitement des diverses maladies ont été constatés (Muthu *et al.*, 2006).

Il est reconnu dans le monde scientifique que les produits d'origines naturelles sont une source importante d'agents thérapeutiques des maladies microbiennes qui font un grand nombre de victimes en termes de taux de mortalité, tel que les composés antimicrobiens excrétés de plantes peuvent inhiber la croissance bactérienne par des mécanismes différents (Hart et Shears, 1997).

L'augmentation du phénomène de la résistance bactérienne aux antibiotiques est un problème de santé qui lié principalement à la prise répétée et massive de ces produits a engendré une perte d'efficacité des antibiotiques

Les plantes médicinales constituent un groupe numériquement vaste des plantes économiques importantes. Elles offrent une solution d'alternatif aux médicaments, elles contiennent des composants actifs résultants de métabolite secondaire produits à partir de métabolisme des nutriments qui sont utilisés par l'homme dans son arsenal thérapeutique. Ces composants actifs se distinguent par plusieurs catégories telles que les alcaloïdes, les flavonoïdes, les tanins, les huiles essentielles et d'autres composées (El kalamouni *et al.*, 2010)

Les industries alimentaires utilisent des substances de type additif alimentaire pour assurer la conservation de leur produits, ces substances peuvent être synthétique (nature chimique), qui provoque avec le caractère d'accumulation et par le temps des dégâts sur la santé des consommateurs. La tendance actuelle des consommateurs à rechercher une alimentation plus naturelle, a entraîné un regain d'intérêt des scientifiques pour ces substances (Essawi et Srour, 2000).

Des études ont été menées sur le développement des nouvelles applications et l'exploitation des propriétés naturelles des huiles essentielles dans le domaine alimentaire. Les huiles essentielles, actuellement employés comme arômes alimentaires, ils sont également connus pour posséder des activités antimicrobiennes et pourraient donc servir d'agents de conservation alimentaires (Mouna, 2015).

Dans ce contexte s'inscrit le présent travail qui a pour objectif la recherche de nouvelles substances naturelles d'origine végétale à activité antibactérienne par l'évaluation de l'effet antibactérien des différents extraits d'*Artemisia herba alba* (des huiles essentielles, extrait éthanolique, extrait aqueux) sur des bactéries pathogènes et nous visons la possibilité d'utilisation des huiles essentielles comme agent naturel conservateur de lait cru de vache.

Le présent travail est structuré autour de quatre chapitres dont le premier est consacré à dériver les notions essentielles à la compréhension de notre travail (les principales informations sur l'espèce étudiée, notions générales sur les huiles essentielles et les polyphénols). Le deuxième chapitre comprend des informations sur le lait cru de vache. Le troisième chapitre décrit la méthodologie adoptée. Le quatrième chapitre consiste à une analyse des résultats obtenus et leur discussion. Enfin le manuscrit se terminera par une conclusion générale.

Partie I

Synthèse bibliographique

Chapitre 1

Généralité sur la plante

1.1. *Artemisia herba alba*

1.1.1. Nomenclature

- Nom scientifique : *Artemisia herba-alba* synonyme *Artemisia herba-alba* Asso ou *Artemisia incultadel* (Quezel et Santa, 1963).

- Noms vernaculaires : Wormwood (Anglais) (Aouadhi, 2010) ; Armoise blanche (Français) ; Chih (Arabe) dans toute l'Afrique du Nord et en Moyen-Orient et dans d'autres régions sous le nom d'Ifsi et Zezzare (Quezel et Santa, 1963).

1.1.2. Description botanique

Artemisia herba alba (Armoise blanche) est une espèce du genre *Artemisia* qui appartient à la famille des Astéracées (Baba Aissa, 2000). C'est une plante herbacée à tiges ligneuses, ramifiées et tomenteuses de 30 à 50 cm de long ; les feuilles sont courtes, sessiles, pubescentes et argentées ; les capitules sont groupés en panicules de petite taille de 1,5 à 3 mm allongés et étroits contenant de 3 à 6 des fleurs jaunâtres ; les bractées externes de l'involucre sont orbiculaires et pubescentes ; les fruits sont des akènes, la croissance végétative de l'armoise blanche prend lieu en automne la floraison commence en juin et se développe essentiellement à la fin de l'été (Ghrabi et Sand, 2005).

1.1.3. Distribution géographique

L'Armoise est largement répandue depuis les îles Canaries et le sud-est de l'Espagne jusqu'aux steppes d'Asie centrale (Iran, Turkménistan, Ouzbékistan) et à travers l'Afrique du Nord, et le Proche-Orient. Elle pousse dans l'ensemble des pays du bassin méditerranéen (Nabli, 1989).

1.1.4. Classification

D'après Quezel et Santa (1963), la classification qu'occupe *Artemisia herba alba* est la suivante :

- Règne: Plantae.
- Embranchement: phanerogames.
- Classe: Dicotyledones.
- Ordre: Asterales.
- Famille: composeae.
- Genre: *Artemisia*.

- Epèces: *Artemisia herba alba*.

1.1.5. Utilisation traditionnelle de la plante

Artemisia herba alba est très utilisé en médecine traditionnelle lors d'un désordre gastrique tel que la diarrhée et les douleurs abdominales. Elle est aussi utilisée en tant que remède de l'inflammation du tractus gastro-intestinal (Ghrabi et Sand, 2008), l'armoise blanche était reconnue depuis longtemps par les populations pastorales et nomades pour ses vertus purgatives. On l'utilise notamment comme vermifuge chez les ovins (Nabli, 1989). Cette plante possède des propriétés thérapeutiques, et non seulement elles utilisées dans la médecine traditionnelle, mais aussi dans l'industrie alimentaire (Mirjalili *et al.*, 2007). Bendjilali *et al.* (1984) ont montré que, l'armoise blanche est considérée comme l'arome de certaines boissons comme le thé ou le café.

1.1.6. Activités biologiques

Plusieurs études scientifiques ont également prouvées l'efficacité de l'armoise blanche en tant qu'agent antidiabétique (Tastekin *et al.*, 2006), antiparasitaire, antibactérien, antiviral, antioxydant, anti malarien, antipyrétique, antispasmodique et antihémorragique (Yin *et al.*, 2008).

1.2. Les huiles essentielles

1.2.1. Définition

Les huiles essentielles sont synthétisées par des plantes aromatiques, elles sont des mélanges naturels complexes des métabolites secondaires volatiles (Kalemba, 2003), sous forme liquide, incolores ou jaune pâle, odorantes et non grasses, (Charpentier *et al.*, 2008).

1.2.2. Répartition et localisation

Les huiles essentielles n'existent que chez les végétaux supérieurs (Bruneton, 1999), elles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : les fleurs, les feuilles, les écorces, les bois, les racines, les rhizomes, les fruits et les graines (Sangwan *et al.*, 2001) et elles sont contenues dans structure spécialisées à savoir : les poils, les canaux sécréteurs et les poches (Couic-Marinier et Lobstein, 2013).

1.2.3. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des liquides volatils, inflammables, à la température ambiante, ce qui les différencie des huiles « fixes ». Elles sont liposolubles et soluble dans solvant organique, mais très peu soluble dans l'eau, leur densité est le plus souvent inférieure à 1, elles s'oxydent au contact de l'air et de la lumière. Elles se caractérisent par différentes

indices, indice d'acide, indice d'ester, indice de saponification et indice de carbonyle (Charpentier *et al.*, 2008).

1.2.4. Composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes pouvant contenir plus de 300 composés différents. Ces composés sont des molécules volatiles appartiennent principalement à deux grandes familles de composés chimiques : les composés terpénique et les composés aromatique (Sell, 2006).

1.2.4.1. Les composés terpéniques

Ils sont des hydrocarbures naturels, de structure cyclique ou de chaîne ouverte, leur formule brute est $(C_5H_X)_n$ avec une ou plusieurs fonctions chimique (alcool, aldéhyde, cétone, acide, lactone). Ils sont subdivisés selon le nombre d'entités isoprènes (Charpentier *et al.*, 2008).

Dans les huiles essentielles, seuls seront rencontrés les terpènes les plus volatils. C'est adire, ceux dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée : monoterpènes et sesquiterpènes (Bruneton, 1999).

a) Monoterpènes ($C_{10}H_{16}$)

Ils constituent parfois plus de 90% de l'huile essentielle. Ils peuvent être acycliques (myrcène, ocymène), monocyclique (terpinène, p-cimène) ou bicyclique (pinène, sabinène) (Bruneton, 1999).

b) Sesquiterpènes ($C_{15}H_{24}$)

Un grand nombre de Sesquiterpènes sont des constituants habituels des huiles essentielles des végétaux supérieurs attribués à ces fractions volatiles (Bruneton, 1999).

1.2.4.2. Les composés aromatiques

Les dérivés du phénylpropane sont beaucoup moins fréquents que les précédents, ce sont très souvent des allylphénols, propénylphénols, anéthol, aldéhyde, apiol, eugénol. On peut également rencontrer dans les huiles essentielles des composés comme la vanilline ou comme l'authranilate de méthyle (Bruneton, 1999).

1.2.5. Activité antibactérienne des huiles essentielles

Plusieurs études ont montrés que les huiles essentielles sont capables d'inhiber la croissance de plusieurs microorganismes, ils peuvent avoir une double action contre les microbes, elles peuvent les tuer (effet bactéricide) ou arrêter leur prolifération (effet bactériostatique) (Moro-Buronzo, 2008), leur action se déroule en :

Attaque la paroi bactérienne, ce qui provoque une augmentation de la perméabilité ; acidification de l'intérieur de la cellule provoquant la coagulation des constituants cellulaires par la dénaturation des protéines ; destruction du matériel génétique qui cause la mort de la bactérie (Calsamiglia *et al.*, 2007 ;Goetz et Ghedira, 2012).

1.3. Les polyphénols

Les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux, caractérisés par la présence d'au moins d'un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle libre, ou engagé dans une autre fonction (Bruneton, 1999). On peut distinguer les différentes classes des polyphénols en se basant d'une part, sur le nombre d'atomes constitutifs et d'autre part, sur la structure de squelette de base, on peut ainsi définir : les flavonoïdes, les tannins, etc.

1.3.1. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont présentes dans la plupart des plantes. Ils constituent l'un des plus vastes groupes de polyphénols naturels et présentent un large champ d'activité biologique (Ritcher, 1993). Ce sont des substances colorées et sont responsables de la coloration de nombreux fruits, fleurs, les feuilles. Ils sont présents dans différentes parties des végétaux supérieurs, selon le type de l'espèce ils peuvent se trouver dans : les racines, les tiges, les feuilles, les fleurs, le pollen, les fruits, les graines, le bois (Adrian *et al.*, 1995).

1.3.1.1. Activité antibactérienne des flavonoïdes

Les flavonoïdes ont une activité antibactérienne très vaste et très diversifiée. En effet, ils s'attaquent à un grand nombre de bactéries avec une intensité différente selon le microorganisme et l'écosystème dans lequel il se trouve (Babayi *et al.*, 2004). Selon les travaux de Dadi *et al.* (2009) la quercétine serait capable d'inhiber la gyrase bactérienne par deux mécanismes :

- Elle se fixe sur l'ADN au niveau des sites d'insertion de l'enzyme bloquant ainsi son activité.
- Elle bloque le site de fixation de l'ATP se trouvant sur l'ADN gyrase.

Dans les deux cas l'action du flavonoïde se manifeste par le clivage de l'ADN bactérien, désormais incapable de subir les modifications topologiques nécessaires à son bon fonctionnement.

Chapitre 2

Le lait cru de vache

2.1. Le lait

2.1.1. Définition du lait cru

Le Codex Alimentaire en (1999), le définit comme étant la sécrétion mammaire normale d'animaux de traite obtenue à partir d'une ou plusieurs traites, sans rien y ajouter ou en soustraire, destiné à la consommation..

Le lait est un liquide biologique opaque, blanc, à odeur peu marquée et au gout douceâtre, sécrété, après parturition, par la glande mammaire des animaux mammifères femelles pour nourrir leur nouveau-né (Marcel, 2002).

2.1.2. Composition chimique du lait de vache

La composition du lait varie d'une espèce de mammifère à une autre car elle est adaptée aux besoins de chacune d'elle. Les principaux constituants du lait par ordre décroissant selon Elmer et Janes (2001) sont :

- L'eau, très majoritaire,
- Les glucides principalement représentés par le lactose,
- Les lipides, essentiellement des triglycérides,
- Les protéines, caséines rassemblées en micelle, albumines et globulines solubles,
- Les sels minéraux à l'état ionique et moléculaire,
- Les éléments à l'état de trace mais au rôle biologique important, enzymes, vitamines et oligoéléments.

2.1.3. Les caractéristiques physico-chimiques du lait

2.1.3.1. La densité

Elle oscille entre 1,028 et 1,034. Elle doit être supérieure ou égale à 1,028 à 20°C (Ghaoues, 2011).

2.1.3.2. Le pH

Le pH renseigne précisément sur l'état de fraîcheur du lait un lait de vache frais à un pH entre 6,4 et 6,8 les différents laits ont une réaction ionique voisine de la neutralité (Boubezari, 2010).

2.1.3.3. L'acidité de titration ou acidité Dornic

L'acidité de titration indique le taux d'acide lactique formé à partir du lactose un lait frais a une acidité de titration de 16 à 18°Dornic (Aby, 2008).

2.1.3.4. Le point de congélation

Le point de congélation du lait est l'une de ses caractéristiques physiques les plus constantes, sa valeur moyenne, si l'on considère des productions individuelles de vache, se situe entre -0,54 °C et - 0,55°C (Ghaoues, 2011).

2.1.4. Qualité organoleptique

La qualité organoleptique d'un produit se dégrade au fil du temps, la durée de stockage, la température et leur action combinée affectent considérablement les attributs sensoriels totaux un lait de bonne qualité organoleptique présente des caractéristiques typiques qui concernant la couleur, l'odeur, la saveur, la viscosité etc. (Veisseyre, 1966).

2.1.5. Qualité microbiologique

2.1.5.1. La flore originelle

Les bactéries lactiques fait partie de la flore normale du lait et se caractérise par son aptitude à fermenter le lactose avec production d'acide lactique et donc, abaissement du pH (Conte, 2008).

2.1.5.2. La flore de contamination

La flore de contamination causera des défauts sensoriels de goût, d'arôme, d'apparence ou de texture et réduira la vie du produit laitier. Les principaux genres identifiés comme flore d'altération sont les coliformes, certains levures et moisissures, les bactéries psychrotrophes et la flore mésophile aérobie totale (Yabouet, 2018).

Les coliformes : cependant, lorsqu'ils sont en nombre très élevé, peuvent provoquer des intoxications alimentaires, le dénombrement des coliformes a longtemps été considéré comme un indice de contamination fécale comme les entérobactéries totales, ils constituent un bon indicateur de qualité hygiénique (Labioui, 2009).

Les levures et les moisissures : sont des microorganismes aérobies facultatives, se développent en surface formant des « boutons » de nature mycélienne. Les moisissures sont rencontrées dans les poudres lactées préparées et stockées dans de mauvaises conditions, dans le lait en voie d'acidification lactique (Aby, 2008).

Les bactéries psychrotrophes : sont des microorganismes très importants dans l'industrie laitière en raison de leur faculté à pouvoir croître en 0 et 4°C cette plage de températures correspond à celle recommandée pour la conservation du lait (Bornert, 2000).

La flore mésophile aérobie totale : est constituée d'un ensemble de microorganismes variés correspondant aux germes banaux de contamination. Son dénombrement reflète de la qualité microbiologique générale du lait cru et permet de suivre son évolution au cours de sa transformation ainsi le nombre de germes totaux pourra donner une indication de l'état de fraîcheur ou de décomposition (altération) du lait (Benhedane, 2012).

2.1.5.3. La flore pathogène

Différentes espèces bactériennes sont capables de pénétrer dans la mamelle par le canal du trayon et sont excrétées avec le lait en se développant dans la mamelle certains de ces germes en particulier les *staphylocoques* et les *salmonelles* provoquent des mammites avec contamination de lait (FAO, 1995).

a) Salmonelles

Il s'agit d'entérobactéries de 0,7 à 1,5 µm de diamètre, de 2 à 5 µm de longueur et possédant des flagelles leur permettant de se déplacer les principales caractéristiques de ces bactéries sont leur résistance jusqu'à une température de 50°C, le ralentissement et non l'arrêt de leur croissance à une température inférieure à 10°C et leur capacité à résister à la congélation, aux produits acides et à la déshydratation (Geneviève, 2007).

b) Staphylocoques

Le genre *Staphylococcus* appartient à la famille des Staphylococaccae ce sont des coques à Gram positif de 0,5 à 2,5 µm de diamètre, non sporulés et immobiles. Elle est cultivée à des températures comprises entre 6 °C et 46 °C (température optimale : 37 °C), à un pH compris entre 4 et 9,8 (pH optimum : 6 à 7) et une Aw très réduite 0,83 (Brisaboi *et al.*, 1997).

2.1.6. Source de contamination du lait

2.1.6.1. Les composés chimiques

Selon Kizi et Makdoud (2014) nous avons trois groupes :

a) Antibiotiques

Les résidus d'antibiotiques, surtout si ces substances sont appliquées localement pour le traitement des mammites.

b) Pesticides

Les résidus de pesticides sont des substances polychlorées, liposolubles, et s'accumulent donc dans les graisses de réserve.

c) Métaux

Parmi les métaux susceptibles de contaminer le lait à des taux inquiétants pour la santé : le sélénium, l'arsenic, le plomb et le mercure.

2.1.6.2. Mauvaises Hygiène de la traite

La traite du lait dans les fermes est manuelle et les pratiques hygiéniques des trayeurs (eau de traite de mauvaise qualité, ustensiles de traite mal lavés, mains sales des trayeurs, particules de bouses passant dans le lait lors de la traite, mamelles sales non nettoyées) constituent un risque évident de contamination microbienne (Geneviève, 2007).

2.1.7. Principales activités des microorganismes dans le lait

Selon Conte (2008) le processus de dégradation est possible, on distingue :

- **L'acidification** : c'est une production d'acide lactique à partir du lactose par les ferments lactiques lors de leur croissance.

- **La protéolyse** : c'est la dégradation des protéines du lait avec formation de peptides, dont certains donnent des mauvais goûts aux produits laitiers.

- **La lipolyse** : c'est la libération d'acides gras à partir des triglycérides du lait, entraînant un goût de rance.

- **La production de gaz** : certaines bactéries (hétéro fermentaires, bactéries telluriques) au cours de leur croissance produisent des gaz.

2.1.8. Conservation et réfrigération du lait cru

Le lait à la sortie de la mamelle est très souvent contaminé, il est important alors de stopper le développement des micro-organismes et d'éviter toute altération du lait jusqu'à son utilisation, il existe deux méthodes de conservation :

2.1.8.1. La réfrigération

Aujourd'hui, la technique la plus répandue est le stockage du produit de la traite dans des tanks réfrigérés à +4°C au maximum (Pougheon *et al.*, 2001).

2.1.8.2. Les conservateurs

Autre technique pour la conservation c'est l'utilisation des conservateurs. Ce sont des substances qui prolongent la durée de vie d'un aliment en protégeant des altérations dues aux

micro-organismes (bactéries, levures, moisissures) ces conservateurs sont parmi les substances qui ont rendu service à l'humanité, la protégeant ainsi des toxines, micro-organisme et dégradations importantes provoquées par le développement opportuniste de contaminants (Reynal et Mescle, 2009).

Partie II

Etude expérimentale

Chapitre 3

Matériel et méthode

3.1. Matériel végétale

3.1.1. La récolte de la plante

La plante d'*Artemisia herba alba* été récolté au mois de janvier 2019, la plante situé dans la région El Kantara (wilaya de Biskra).



Figure 1. *Artemisia herba alba*.

3.1.2. Le séchage de la plante

La partie aériennes de l'espèce *Artemisia herba alba* été séchées à l'air, à l'abri de la lumière, pendant 15 jours puis conservées dans des sacs propres en papier jusqu'à au moment de l'extraction.

3.2. Matériel microbien

Les souches utilisées pour déceler l'activité antibactérienne des extraits font partie de quatre genres de microorganismes, sont des souches référentielles (ATCC), il s'agit de: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25293), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853) et *Salmonella sp.*

3.3. Extraction des huiles essentielles

L'extraction de l'huile essentielle à partir de la partie aériennes d'*Artemisia herba alba* à été réalisée par hydrodistillation dans un appareil de type clevenger (Ismaili *et al.*, 2014).

Après avoir pesé 100 g de matière végétale sèche est mises dans un ballon en verre pyrex, additionnées de 1000 ml d'eau distillé, l'ensemble est porté à l'ébullition dans un chauffe- ballon pendant 3 heures à température 100°C le vapeur chargée de substances volatiles traversent le réfrigérant et se condensent.

Après condensation, on a récupéré dans une ampoule à décanter, laissé le mélange au repos quelque minutes, ce qui résulte l'apparition de deux phases, l'une est organique (huile

essentielle) et l'autre est aqueuse en fin, l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* sera récupérée dans un flacon propre et stérile.



Figure 2. Montage d'hydrodistillation de type Clevenger.

3.3.1. Conservation des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont conservées dans un flacon en verre fermé dans un réfrigérateur (4°C) à l'abri de la lumière.

3.3.2 .Rendement de l'huile essentielle

Selon la norme Afnor (1986), le rendement en huile essentielle (Rd), est

$$Rd = M' / M \cdot 100$$

- **Rd** : Rendement en huile essentielle exprimée en pourcentage (%).
- **M'**: Masse de l'huile essentielle obtenue en gramme (g).
- **M**: Masse de la matière végétale sèche utilisée en gramme (g).

3.4. Préparation des extraits d'*Artemisia herba alba*

3.4.1. Extrait brut éthanolique

Dans ce travail nous avons tenté d'extraire les composés phénoliques totaux. C'est une extraction solide-liquide le principe consiste à dissoudre le principe actif à l'intérieur du solide et l'entraîner à l'extérieur en utilisant un solvant. La plupart des auteurs suggèrent que

l'entrée du solvant se fait par un mécanisme osmotique et la sortie du soluté par dialyse ou par diffusion (Ribereau- Gayon, 1968). On a utilisé l'éthanol comme solvant.

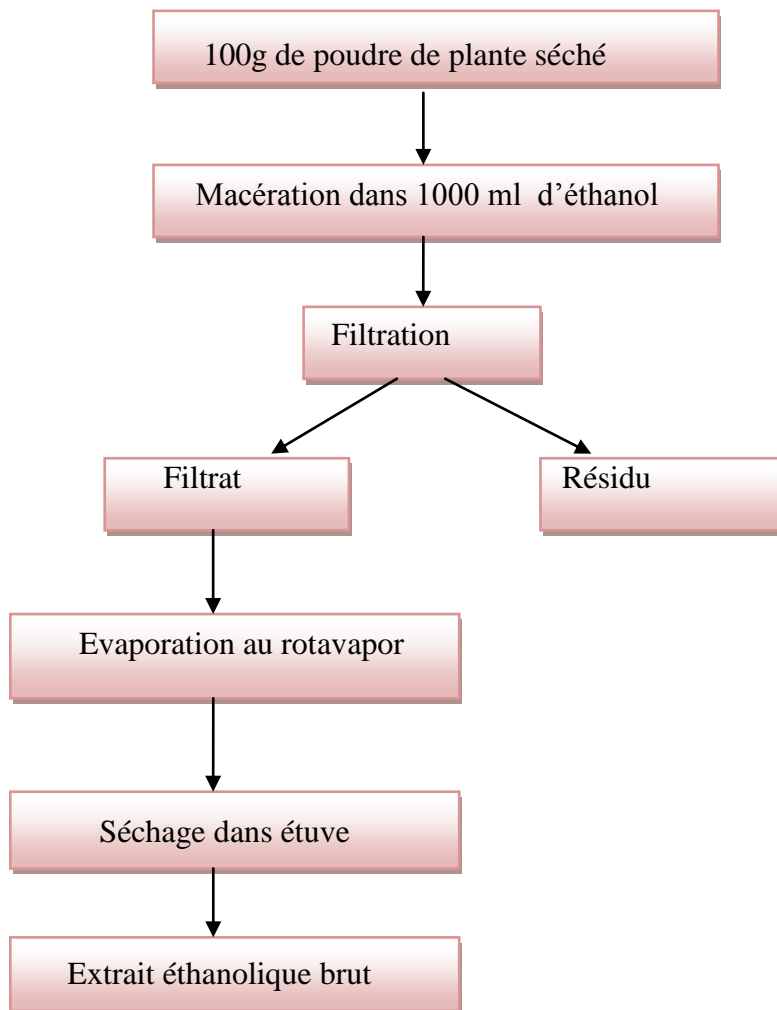


Figure 3. Schéma représente les étapes de protocole appliqué pour l'extraction éthanolique.

3.4.2. Extrait aqueux

Préparation des extraits aqueux selon la méthode de (Ghedadba *et al.*, 2014). Une macération aqueuse a également été effectuée sur 100 g de poudre avec 1000 ml d'eau distillée et placés sous agitation pendant 24 h après filtration l'extrait a été lyophilisé (voire figure 4).

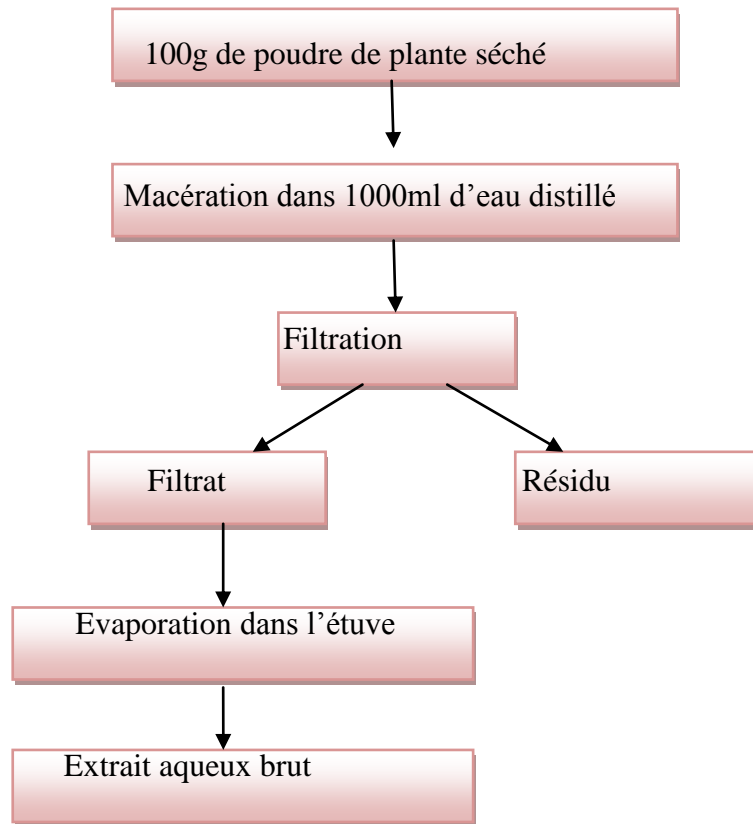


Figure 4. Schéma représente les étapes de protocole appliqué pour l'extraction aqueux.

3.4.3. Rendements en extraits

On a déterminé le rendement (Rd) des plantes en extrait sec en calculant le rapport suivant:

$$\text{Rd (\%)} = \frac{M}{M'} \times 100.$$

- **Rd (%)**: Rendement exprimé en %.
- **M**: Masse en grammes de l'extrait sec résultats.
- **M'**: masse de la matière végétale à traiter.

3.5. Etude quantitative des métabolites des extraits d'*Artemisia herba alba*

3.5.1. Dosage des phénols totaux

❖ Principe

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué avec le réactif colorimétrique Folin Ciocalteu selon la méthode Singleton et Rossi (1965).

Le réactif de Folin Ciocalteu est un acide de couleur jaune qui est basée sur la réduction en milieu alcalin de le mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃PMo₁₂O₄₀) du réactif de folin par les groupements oxydables des composés phénoliques, conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleue (Talbi *et al.*, 2015).

❖ Mode opératoire

Un volume de 200 µl pour chaque extrait de plante est introduit dans des tubes à essais, le mélange (1 ml de Folin Ciocalteu dilué 10 fois) après 4 minute 800 µl de carbonate de sodium à 7.5 % est additionné (voire annexe 3). Le mélange est agité et laissé à l'obscurité à une température ambiante pendant 2 heures. Un témoin est préparé dans les mêmes conditions. L'absorbance est mesurée à 765 nm.

Une courbe d'étalonnage à différentes concentrations d'acide gallique a été préparée (0-250ug/ml).

3.5.2. Dosage des flavonoïdes totaux

❖ Principe

La quantification des flavonoïdes dans l'extrait a été effectuée par une méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium (AlCl₃) adaptée par Bahorun *et al.* (1996).

En présence d'AlCl₃, les flavonoïdes, absorbance à 430nm, concentration (µg/ml). dihydroxylés sur les noyaux A ou B et les groupements hydroxyles libres en position C-3 et C-5 ou le groupement cétonique en position C-4, sont capables de former un complexe acide stable de couleur jaunâtre absorbe dans le visible à 430nm.

❖ Mode opératoire

1 ml de chaque extrait est ajouté 1ml de solution de chlorure d'aluminium (AlCl₃) à 2% dans chaque solvant (éthanol et l'eau distillé) (voire annexe 4). Un témoin est préparé dans les mêmes conditions. Dix minutes après le début de la réaction, l'absorbance est lue à 430 nm.

Une gamme étalon est établir séparément avec la quercitrine (0-40ug/ml) pour calculer la concentration des flavonoïdes dans chaque extrait.

3.6. Evaluation de l'activité antibactérienne

Deux méthodes différentes sont employées pour l'évaluation de l'effet antibactérienne des huiles essentielles et des extraits.

- La méthode de diffusion sur disque en milieu gélosée.
- La méthode de micro-dilutions en milieu liquide (CMI et CMB).

3.6.1. Méthode de diffusion sur disque (aromatogramme)

La méthode repose sur la diffusion du composé antibactérien dans le milieu solide dans une boîte de pétri, avec les disques qui sont dans chaque extrait au contact de produit avec le microorganisme.

➤ Repiquage des souches bactériennes

Les différentes souches bactériennes ont été repiquées par la méthode des stries sur gélose nutritive, puis incubées à 37°C pendant 24 heures afin d'obtenir des colonies bactériennes jeunes et isolées servant à préparer l'inoculum.

➤ Préparation de l'inoculum bactérien

L'inoculum a été préparé en prélevant des colonies bactériennes bien isolées et identiques dans un tube contenant 9 ml d'eau physiologique stérile la densité de l'inoculum a été ajustée à 0,5 Mc Farland (correspond à environ $1,5 \times 10^8$ UFC / ml).

0,5 Mc Farland ou à une densité optique de 0,08 à 0,10 à 625 nm (ce qui correspond à environ 108 UFC/ml) (Casfm, 2018) (voire figure 5).

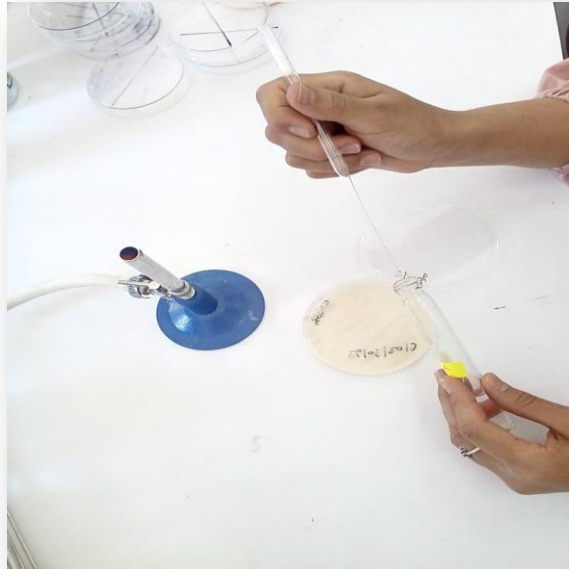


Figure 5. Préparation de l'inoculum bactérien.

➤ **Ensemencement des bactéries**

Les bactéries ont été ensemencées en utilisant la méthode d'écouvillonnage un écouvillon stérile est imbibé dans la suspension bactérienne puis essoré en le pressant fermement sur la paroi interne du tube afin de décharger au maximum l'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas, en stries serrées l'opération est répétée deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même et en le passant sur la périphérie de la gélose MH.

➤ **Préparation des extraits**

L'huile essentielle, l'extrait éthanolique et aqueux ont été préparée en utilisant le DMSO 10% qui est inerte sur l'activité bactérienne une concentration de 100mg/ml de chaque extrait permet la mise en évidence de l'activité antibactérienne.

➤ **Dépôts des disques imprégnés des extraits**

Après ensemencement, des disques de diffusion (papier Wathman N°1 stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 15 min) sont déposés à la surface des boîtes ensemencées à l'aide d'une pince stérile, ces disques sont injectés par 20ul des extraits (Gulluce *et al.*, 2003).

Deux témoins ont été réalisés : un disque de gentamicine (10µg) sert comme contrôle positive et un disque imprégné par le DMSO 10% sert comme un contrôle négatif (voire figure 6).



Figure 6. Dépôts des disques imprégnés des extraits.

Tous les tests ont été répétés trois fois pour calculer les moyennes et les erreurs standards à la moyenne.

Les boîtes sont maintenues à la température du laboratoire pendant 30 mn afin de permettre la pré-diffusion ensuite, elles sont incubées à 37°C pendant 24 heures.

➤ **Lecteur des résultats**

La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'un pied de coulisse.

Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisé par des signes d'après la sensibilité des souches en mm (ponce *et al.*, 2003) :

- **Non sensible (-) ou résistante** : diamètre < 8 mm.
- **Sensible (+)** : diamètre compris entre 9 à 14 mm.
- **Très sensible (++)** : diamètre compris entre 15 à 19mm.
- **Extrêmement sensible (+++)** : diamètre > 20 mm.

3.6.2. Détermination de la Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI)

❖ **Principe**

La micro-dilution est généralement effectuée dans des plaques de 96 puits à fond arrondi. Les suspensions bactériennes ont été diluées avec du bouillon et distribuées dans ces plaques (Kahlmeter et Turnidge, 2012).

❖ Mode opératoire

Une solution mère de l'huile essentielle d'extrait éthanolique et aqueux a été préparée dans le DMSO à 10%, puis des dilutions en série de ont été faites dans la microplaque de 96 puits. 100 µl de DMSO 10% a été déposé dans tous les puits, 90µl de bouillon Mueller Hinton ont été incorporé puis ensemencé par 10 µl de l'inoculum bactérien standardisé. Le volume final dans chaque puits était de 200 µl.

La gamme de concentrations finales ainsi obtenue correspond à $1/2 - 1/4 - 1/8 - 1/16 - 1/32 - 1/64 - 1/128 - 1/256 - 1/512$. Tous les essais sont répétés trois fois. Un contrôle positif contenant 10 µl d'inoculum et 190 µl de Bouillon Muller Hinton, et un témoin négatif contenant 100 µl d'huile essentielle ou d'extrait éthanolique ou aqueux dissoute dans du DMSO à 10% et 100 µl de bouillon Muller Hinton sans inoculum (voire figure 7).

Les plaques ont été recouvertes et incubées à 37 °C pendant 24 heures.

La CMI a été définie comme la concentration minimale d'extrait pour laquelle on n'observe pas de croissance visible a l'œil nu.

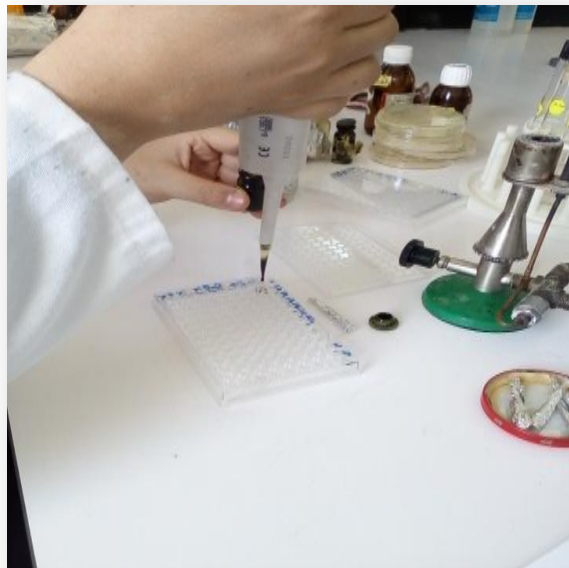


Figure 7. La méthode de micro-dilutions en milieu liquide(CMI).

3.6.3. Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide

La CMB a été déterminée en prélevant 100 µl de chaque suspension dans les puits sans croissance visible et en ensemençant de la gélose MH. L'incubation s'est faite à 37 °C pendant 48 heures au bout desquelles on a procédé au comptage des colonies (voire figure 8)

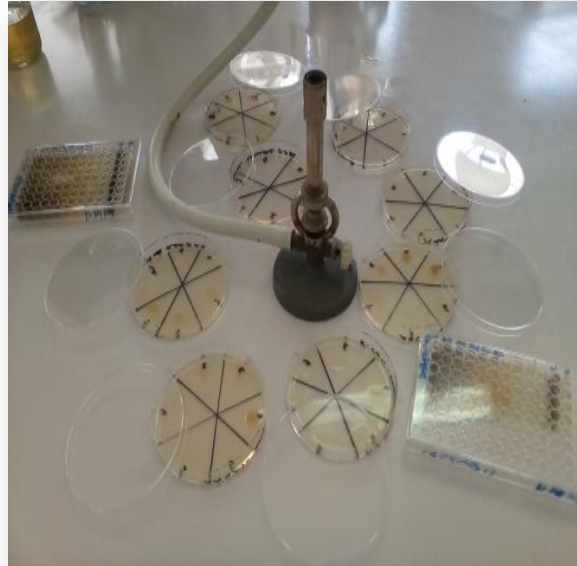


Figure 8. Détermination de la concentration Minimale Bactéricide(CMB).

3.7. Utilisation des huiles dans le processus de la bio-conservation

3.7.1. Procédure d'échantillonnage

Le lait a été mené durant la période s'étalant de mai à juin 2019, au niveau d'une ferme située dans la région « Saada » wilaya de Biskra.

Les prélèvements ont été collectés dans un flacon stérile de 1L d'une façon aseptique puis acheminés immédiatement dans une glacière vers le laboratoire de microbiologie de la Faculté des sciences d'Elhadjeb. Dès leur arrivée au laboratoire les échantillons ont fait l'objet d'une série d'analyses microbiologique et physico-chimiques.

3.7.2. Préparation des huiles essentielles

A partir d'une solution mère de l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba*, trois concentrations de CMI : 12.5 mg/ml, 25 mg/ml et 6,25 mg/ml ont été préparé en utilisant le DMSO 10%. Les différentes concentrations sont obtenu en utilisant la formule $C1V1=C2V2$.

3.7.3. Préparation des échantillons à conserver

Le lait cru prélever et acheminé au laboratoire est distribué dans des flacons stériles à raison de 100 ml de lait crus pour chaque flacon. Les différentes concentrations de l'huile ont

été rajoutées dans le lait puis homogénéisé. Un témoin négatif a été préparé sans addition de l'huile essentielle.



Figure 9. Préparation des échantillons.

Les différents échantillons sont ensuite conservés à température de réfrigération de 4°C pendant 13 jours. Les analyses ont été réalisées chaque 3 jours (jour 0, jour 3, jour 7, jour 10, jour 13).

3.8. Analyses du lait cru pendant la conservation

3.8.1. Analyse microbiologique du lait cru pendant la conservation

Le contrôle microbiologique a été réalisé selon les techniques décrites par Guiraud (2003) :

3.8.1.1. Préparation des dilutions décimales

Après agitation des flacons on prélève à l'aide d'une micropipette avec l'embout stérile 1ml du lait que l'on ajoute à 9 ml de l'eau physiologique contenu dans un tube à essai. Puis on agite sur vortex puis on procède à des dilutions successives jusqu'à 10^{-5} .

3.8.1.2. Dénombrement de la flore totale mésophile (FTAM)

❖ Principe

Le dénombrement a été réalisé sur gélose Plate Count Agar (PCA). Son dénombrement reflète la qualité microbiologique générale d'un produit naturel et permet d'en suivre l'évolution. Le nombre des germes « totaux » pourra donner une indication de l'état de fraîcheur ou de l'état de décomposition du produit (Guiraud, 2003).

❖ Mode opératoire

- Préparer les boites de pétries stériles.
- Inoculer des boites par 1 ml de chaque dilution (10^{-1} jusqu' à 10^{-5}).
- Ajouter 15 à 20 ml de milieu de gélose PCA.
- Le mélange est homogénéisé par des mouvements circulaires.

Après solidification, les boites sont retournées puis incubées à 37°C pendant 24 heures, l'opération est réalisée en double. Après cette durée, on dénombre les colonies lenticulaires (Bourgeois *et al.*, 1996) .

3.8.1.3. Dénombrement des micro-organismes psychotrophes**❖ principe**

Afin de quantifier cette population, le dénombrement des germes a été réalisé sur gélose Plate Count Agar (PCA) avec des dilutions.

❖ Mode opératoire

- Préparer les boites de pétries stériles.
- Inoculer les boites par 1 ml de chaque dilution (10^{-1} jusqu' à 10^{-5}).
- Ajouter 15 à 20 ml de milieu de gélose PCA.
- Le mélange est homogénéisé par des mouvements circulaires.

Après solidification, les boites sont retournées puis incubées à 4°C pendant 13 jours, l'opération est réalisée en double.

3.8.1.4. Détermination du nombre UFC/ml

Les colonies ont été comptées pour chaque dilution pour déterminer le nombre d'UFC/ml en utilisant la formule suivante :

$$\text{UFC/ml} = \text{nombre de colonies} \times 1/\text{Ve} \times 1/\text{D}$$

Ve : étant le volume d'ensemencement.

D : étant la dilution prise en compte.

3.8.2. Analyses physico-chimiques

Afin d'avoir une idée sur la qualité des laits collectés, plusieurs paramètres physico-chimiques sont évalués :

3.8.2.1. pH

Le pH est obtenu à l'aide d'un pH-mètre. La valeur est lue directement sur le pH mètre après immersion de son électrode dans le lait.

3.8.2.2. Acidité titrable

À 10 ml de lait, on ajoute une goutte de phénol phtaléine à 1 % puis on suit l'acidité en ajoutant la solution de la soude à 0.1 N (voir annexe 2) goutte à goutte à l'aide d'une burette à robinet jusqu'à l'obtention d'une coloration rose persistante. Le résultat est calculé en fonction de la quantité de la soude ajoutée. Le changement de couleur détermine le volume de soude (Guiraud, 2003).

Les L'acidité du lait peut être exprimée par la formule suivante :

$$AT = V \times 10(D^\circ).$$

AT: Acidité titrable.

V: le volume en ml correspond à la chute de la burette.

Analyse statistique

Les résultats d'analyse des données statistiques obtenus dans ce travail ont été réalisés par le logiciel « Graph Pad Prism 7 ».

Chapitre 4

Résultats et discussions

4.1. Extraction

L'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* a été obtenue par hydrodistillation. C'est un liquide visqueux, jaunâtre à forte odeur.

L'extrait éthanolique obtenus est de couleur verdâtre foncé à la différence de celui de l'extrait aqueux qui est de couleur brunâtre claire.

4.2. Le rendement

Le rendement des extraits d'*Artemisia herba alba* sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 1. Rendement des extraits d'*Artemisia herba alba*.

La plante	Rendement en %		
	extrait éthanolique	extrait aqueux	huile essentielle
<i>Artemisia herba helba</i>	15.64%±0.01	12.54%±0.02	1.23%±0.00

Les valeurs exprimé la moyenne \pm SD (n = 3).

Dans notre travail le plus faible rendement est présentée par l'huile essentielle par rapport les deux extraits avec une valeur de 1.23%.

Le meilleur solvant d'extraction des composés phénoliques par la méthode de macération est l'éthanol avec un rendement de 15.64%, tandis que l'eau distillée s'avère être faible avec rendement de 12.54%.

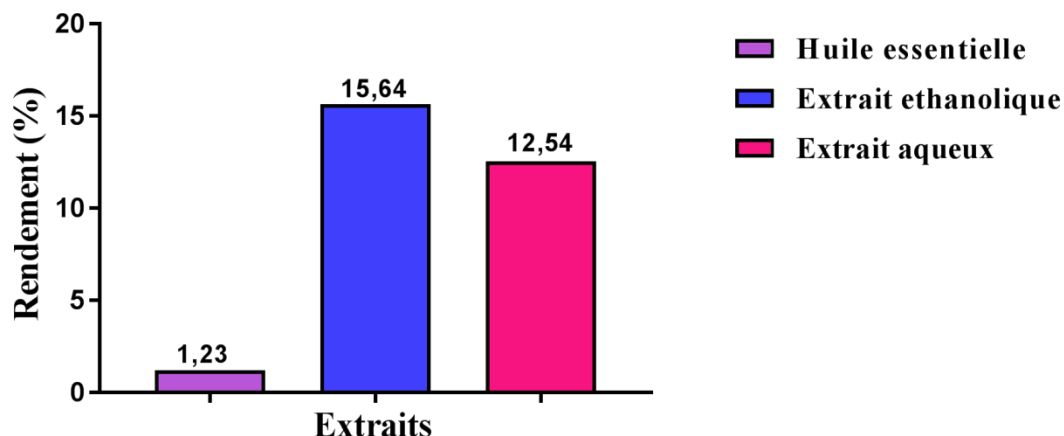


Figure 10. Histogramme représente le rendement des différents extraits d'*Artemisia herba alba*.

Le rendement en huile essentielle d'*Artemisia herba alba* est 1.23 %. Ce rendement peut être considéré comme importante par rapport à certaines plantes qui sont exploitées industriellement comme source d'huiles essentielles. Il est plus élevé que celui de *Menthe* (0.72%) et de *Thymus* (0.65%) (Ismaili *et al.*, 2016).

En comparaison avec d'autres travaux de recherche ce taux considéré plus élevé à celui de l'huile essentielle extraite de la même espèce, récoltée dans la chaîne montagneuse des Matmata en Tunisie (0.65%) (Akrouf, 2004).

Au Maroc, corrélativement à une étude antérieure faite, notre rendement est égal à celui obtenu de la région de Guerçif du mois de juin (1.23 %) toutefois supérieur aux rendements obtenus de mois septembre (0,56%), du mois de Mars (0,86 %) de la même plante (Ghanmi *et al.*, 2010).

Les résultats du rendement de l'extrait éthanolique sont inférieurs au résultat obtenu par Chaabna (2014) avec un rendement de (27.47%), et du Awad *et al.* (2009) avec un rendement de (34.8%) obtenu après une percolation de la poudre de la partie aérienne dans l'éthanol.

Ces variations peuvent être dues à des facteurs abiotiques, tels que le climat spécifique des régions, d'origine des échantillons, des facteurs géographiques comme l'altitude, le type de sol et la saison des cueillettes ((Ismaili *et al.*, 2016).

4.3. Etude quantitative

4.3.1.. Dosage des polyphénols totaux

Les polyphénols totaux ont été déterminés par la méthode de Folin-Ciocalteu. L'acide gallique a été utilisé comme standard. L'absorbance a été lue dans une longueur d'onde de 765 nm. La quantité des polyphénols a été rapportée en milligramme d'équivalent de l'acide gallique par milligramme de poids sec de l'extrait (mg EAC/mg Ps).

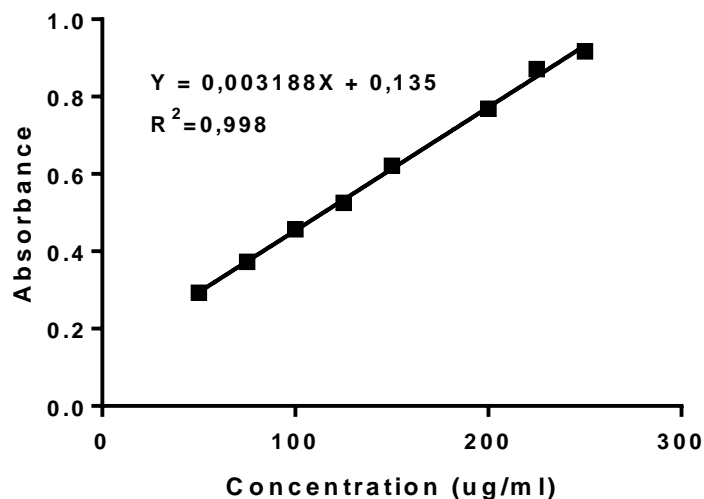


Figure11. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

À partir de la courbe d'étalonnage, les concentrations des polyphénols totaux sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau 2. Dosage des polyphénols totaux.

Extraits	Polyphénols
Ethanolique	143,25±0,09
Aqueux	6,58±0,005

Dans ce travail le contenu en polyphénols totaux montre que l'extrait éthanoliques représente l'extrait la plus riche avec (143.25 mg EQ/g Ps) alors que l'extrait aqueux représente une faible teneur en polyphénole (6.58 mg EQ/g Ps).

Pour l'extrait éthanolique de l'armoise blanche la quantité de polyphénol est inférieure à celle trouvée par Boudjelal (2012) (25.34 ± 0.69 mg EQ/g Ps).

4.3.2. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl₃), la quercétine a été utilisée comme étalon. L'absorbance a été lue dans une longueur d'onde de 430 nm. La quantité des flavonoïdes a été rapportée en milligramme d'équivalent de la quercétine par milligramme de poids sec de l'extrait (mg EQ/mg Ps).

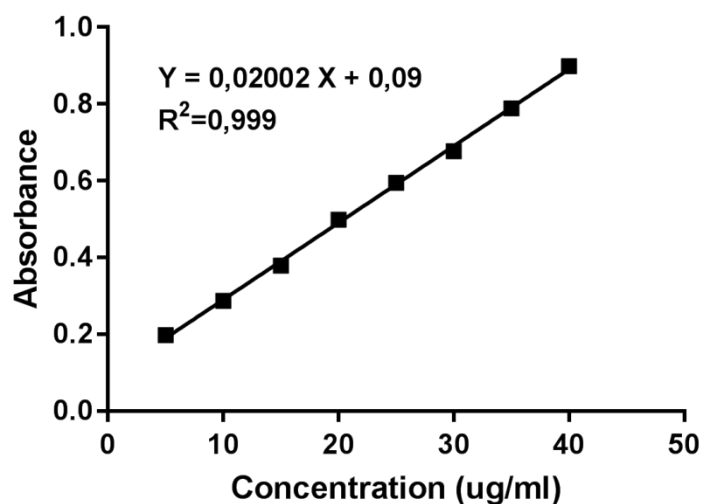


Figure 12. Courbes d'étalonnage de la quercétine.

À partir de la courbe d'étalonnage, les concentrations des flavonoïdes sont comme la suite :

Tableau 3. Dosage des flavonoïdes totaux.

Extraits	Flavonoïdes
Ethanolique	16,77±0,02
Aqueux	5,54±0,11

D'après ces résultats on remarque que l'extrait éthanolique l'extrait la plus riche en flavonoïdes avec 16.77 mg EQ/mg Ps et par contre l'extrait aqueux représente une faible teneur avec 5.54 mg EQ/mg Ps.

Pour l'extrait éthanolique de l'armoise blanche la quantité de flavonoïdes est inférieure à celle trouvée par Younsi *et al.* (2016) avec valeur de 13.96 ± 0.07 mg EQ/mg Ps.

Le teneur des extraits phénoliques et flavonoïdes totaux d'*Artemisia herba-alba* varient en fonction de la complexité de ces composés, la variété des plantes (différentes familles), la différence de la période et la région de récolte et les conditions géographiques, des facteurs environnementaux, du solvant d'extraction et de la méthode d'analyse utilisée (Younsi *et al.*, 2016).

4.4. Etude du pouvoir antimicrobien des extraits d'*Artemisia herba alba*

4.4.1. Test de l'aromatogramme

Le pouvoir antibactérien des extraits a été estimé en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les extraits à tester vis-à-vis de la bactérie *Escherichia coli* et les *staphylococcus aureus*, *pseudomonas aeruginosa* et *Salmonella sp.*

Les résultats obtenus pour déterminer l'activité antibactérienne (aromatogramme) des extraits sont présentés dans les tableaux suivant :

Tableau 4. Diamètres des zones d'inhibition de l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba*.

Souches	Zone d'inhibition (mm)			
	Huile	Extrait éthanolique	Extrait aqueux	Gentamycine
<i>S. aureus</i>	16,48±0,11	20,31±0,49	14,47±0,00	33,37±0,59
<i>E. coli</i>	13,90±0,76	19,56±0,09	/	26,47±1,09
<i>P. aeruginosa</i>	/	/	/	32,53±0,22
<i>Salmonella sp</i>	13,94±0,51	/	/	27,66±2,22

Tableau 5. Sensibilités des souches bactériennes de l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba*.

Les souches	Sensibilité (+/-)			
	Huile	Extrait éthanolique	Extrait aqueux	Gentamycine
<i>S. aureus</i>	++	+++	+	+++
<i>E. coli</i>	+	+	-	+++
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	+++
<i>Salmonella sp</i>	+	-	-	+++

D'après les résultats du tableau N°02 et N°3, les bactéries étudiées sont extrêmement sensibles pour le contrôle positif (gentamycine).

Les résultats obtenus montrent que l'huile d'armoise blanche a un effet sur les bactéries *S. aureus* et *E. coli*, *Salmonella sp* d'autre part, nous avons remarqué que l'extrait éthanolique d'*Artemisia herba alba* est l'extrait le plus actif sur les bactéries *S. aureus* et *E. coli*. Bien que l'extrait aqueux ait un effet sur la bactérie *S. aureus* seulement. Alors que la bactérie *P. aeruginosa* n'a pas été affectée par l'action des trois extraits.

L'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* a un effet important sur *E. coli* et *Salmonella sp*, qui sont inhibées avec des diamètres allant de 13.90 mm et de 13.94 mm respectivement. La bactérie *S. aureus* présente une zone d'inhibition de 16.48 mm, elle est très sensible à cette huile.

Notre résultat est supérieur à l'étude de Kahlouche (2014) sur la même plante étudiée avec un diamètre de 13.66 mm pour *S. aureus* et de 7.33 mm pour *E. coli*.

Par contre la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* qui ne marque aucune zone inhibitrice. L'absence d'activité antibactérienne pourrait s'expliquer par la résistance développée de la souche.

Cette activité antibactérienne spécifique des huiles essentielles pourrait être expliquée par les composants bioactifs des HE (effet synergique entre les composants). Ils agissent en particulier au niveau de la membrane et du cytoplasme, et dans certains cas, modifient complètement la morphologie des cellules (Bouyahya *et al.*, 2017).

Les résultats obtenus des extraits aqueux d'*Artemisia herba alba* ont révélé que les souches bactériennes à Gram négatif n'ont montré aucune zone d'inhibition ce qui est traduit par la résistance des souches à l'action des extraits. Alors que la bactérie *S. aureus* Gram+ sensible à cet extrait avec une zone de 14.47 mm.

Par contre les bactéries *S. aureus* et *E.coli* sont sensible vis-à-vis à les extraits éthanoliques de plantes testés avec un diamètre de 20,31 mm et 19,56 mm respectivement.

La différence de sensibilités aux extraits peut être attribuée à la nature chimique des extraits brute testés et en fonction de la souche bactérienne (Kheyar *et al.*, 2014).

4.4.2. Méthode de dilution en milieu liquide

4.4.2.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Après la période d'incubation, on a remarqué l'apparition d'un aspect claire dans les puits de microplaques indique l'inhibition de la croissance bactérienne, et les autres puits montre un aspect trouble indique la croissance bactérienne.



Figure 13. Observation de aspect dans les puits de microplaques.

Les résultats en CMI sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 6. CMI des extraits brute d'*Artemisia herba alba*.

Souches	CMI (mg/ml)		
	Huile	Extrait éthanolique	Extrait aqueux
<i>S. aureus</i>	25	50	100
<i>B E. coli</i>	12,5	50	100
<i>Salmonella sp</i>	6,25	/	/

Les extraits d'*Artemisia herba alba* sont révélés actifs envers les souches bactériennes testées mais avec des degrés différents ce qui s'est traduit par la différence des CMI.

On remarque un effet importante d'huile d'*Artemisia herba alba* sur les souches pathogènes étudiée, nous nous sommes inscrits la CMI 25 mg/ml, 12.5 mg/ml, 6.25 mg/ml pour *S. aureus* et *E. coli* et *salmonella.sp* respectivement.

Goudjil *et al.* (2015) ont étudié l'activité antimicrobienne d'huile essentielle d'*Artemisia herba alba*. Ils ont utilisé plusieurs souches dont *staphylocoques*, *Escherichia coli* et *salmonella* les résultats de CMI obtenus dans cette étude sont 0.16 mg/ml, 0.83 mg/ml et 0.25 mg/ml respectivement ces résultats sont inférieurs à nos résultats.

Les deux extraits (aqueux et éthanolique) possèdent la même CMI pour les souches *S. aureus*, *E. coli* avec une valeur de 50 mg/ml et 100 mg/ml respectivement ces résultats sont supérieur de la CMI de l'extrait éthanolique de la partie aérienne d'*Artemisia Campestris* qui déterminé par boudjouref (2011) qu'il obtient pour la souche *Escherichia coli* la CMI 0.5 mg/ml et de 1.8 mg/ml pour *S. aureus*.

4.4.2.2. Détermination de Concentration minimale bactéricide

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 7. CMB des extraits brute d'*Artemisia herba alba*.

Les souches	CMB (mg/ml)		
	Huile	Extrait éthanolique	Extrait aqueux
<i>S. aureus</i>	50	50	/
<i>E. coli</i>	25	100	/
<i>Salmonella sp</i>	25	/	/

L'effet bactéricide de l'huile d'armoise a été observé avec les trois souches testé avec 50 mg/ml pour *S. aureus* et 25 mg/ml pour *salmonella.sp* et *E.coli*.

Nos résultats de CMB de l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* dépassent les résultats obtenu par Mighri *et al.*(2010) qui ont déterminé la CMB des composants chimique de l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba*. β thujone a montré une CMB de 5 mg /ml et 2.5 mg /ml contre *S. aureus* et *E.coli* respectivement. Cependant α thujone a présenté une CMB de 2.5 mg /ml pour les deux bactéries. En revanche le mélange entre les deux composants (β thujone - α thujone) a montré une CMB de 1.5 mg /ml et 1.25 mg /ml contre *S. aureus* et

E.coli respectivement. Le mélange (cineole-camphor- β thujone - α thujone) a révélé une CMB de 1.25 mg/ml pour *S. aureus* et 0.625 mg/ml pour *E.coli*.

L'extrait éthanolique a été montrés actifs contre *S. aureus* et *E.coli* avec une CMB de 50mg/ml et 100mg/ml respectivement.

Aucun effet bactéricide de l'extrait aqueux sur toutes les bactéries testé.

Les valeurs de la CMB et CMI confirment l'activité antibactérienne des extraits d'*Artemisia herba alba* observée vis-à-vis de ces souches testé.

4.5. Résultats de bio-conservation

Le suivi de la flore totale, les bactéries psychotropes, pH et acidité titrable du lait cru après conservation à 4°C dans le réfrigérateur, et après traitement avec différentes concentration de l'huile a montrés les résultats suivants :

4.5.1. Flore total

Les résultats obtenus sont présentés dans la figure14 ont montré que dans le lait non traité (témoin) ; le nombre de la flore totale a augmenté entre les jours J0 et J3, puis a diminué progressivement le reste des jours de conservation.

Cependant le lait traité avec les trois concentrations de l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* a révélé que le nombre de la flore totale entre les jours J0 et J3 a diminué par rapport au témoin. Tandis que la flore totale a complètement disparu dans J7 à J13.

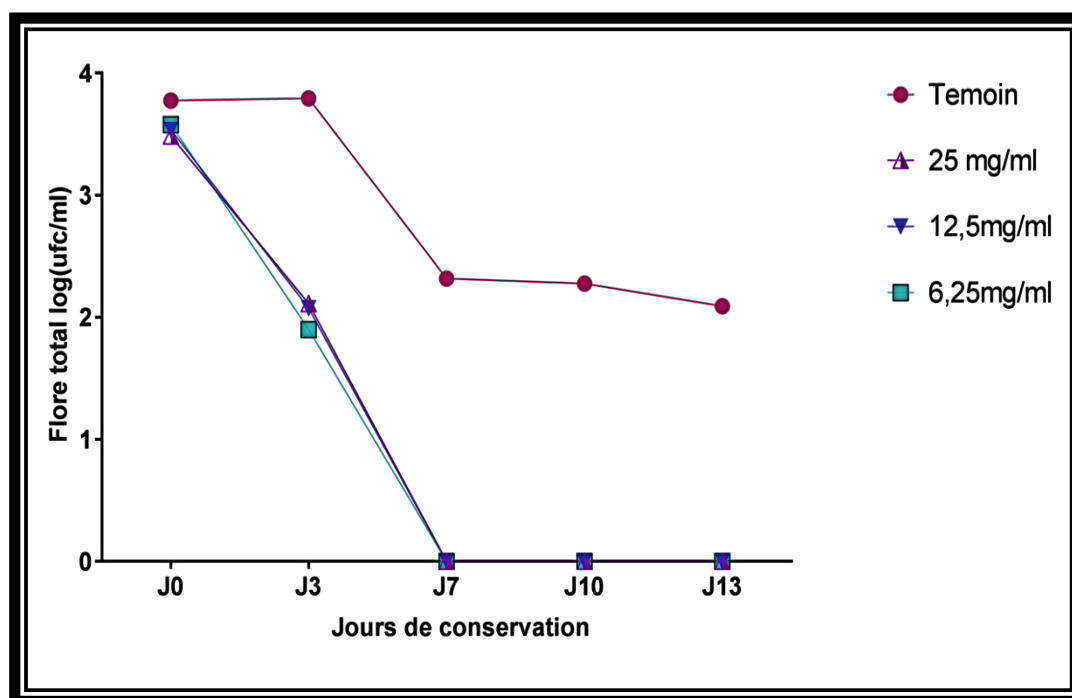


Figure 14. Suivi de la survie de la flore total au cours du temps.

L'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* a démontré leur efficacité à tuer la population de la flore totale (effet bactéricide) dans le lait cru conservé pendant 13 jours. Notre étude montre l'utilisation de l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* comme un agent antibactérien naturel dans le lait cru. Ce travail est similaire aux travaux antérieurs de Selim (2011), qui a confirmé l'efficacité antibactérienne de l'huile essentielle de *Thymus* contre une population d'agent pathogène d'origine alimentaire.

4.5.2. Bactéries Psychotrophes

Les résultats de suivi de la survie des bactéries psychotrophes au cours du temps sont présentés dans la figure 15. Le lait non traité a enregistré une forte augmentation du nombre des bactéries psychotrophes pendant tous les jours de conservation. Alors qu'après traitement avec l'huile, une faible augmentation des psychotrophes a été remarquée durant tous les jours de conservation par rapport au témoin.

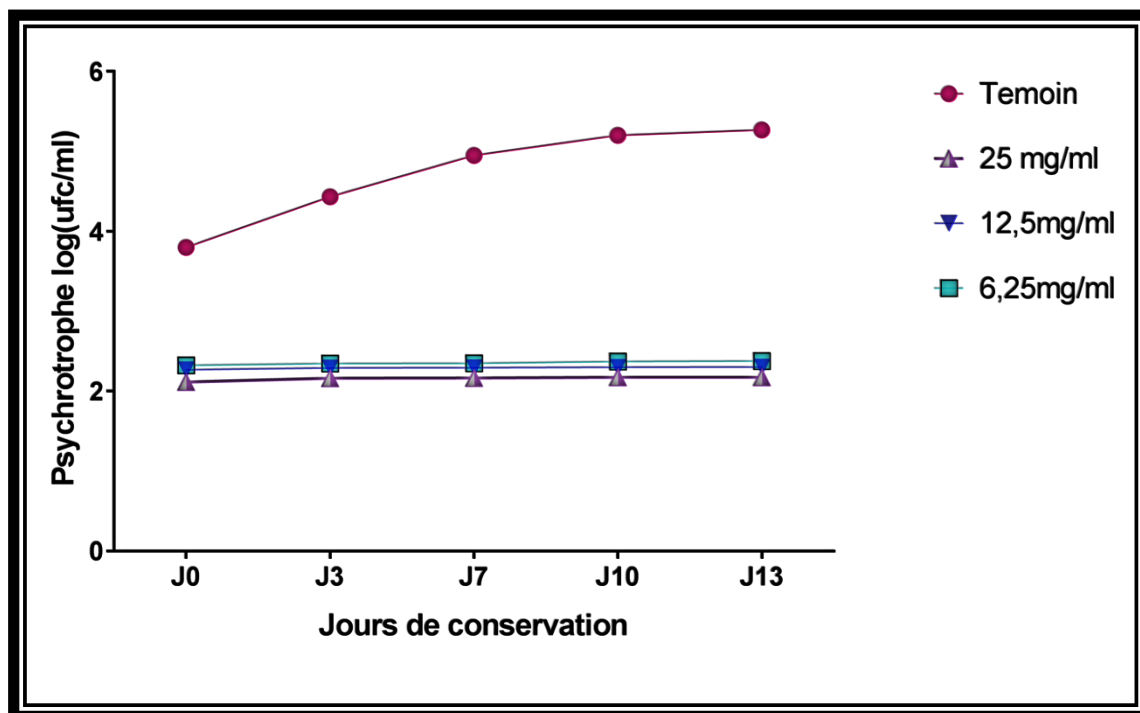


Figure 15. Suivi de la survie des bactéries psychotrophes au cours du temps.

D'après le résultat obtenu, le lait cru conservé à 4 ° C pendant 13 jours a démontré l'efficacité de l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* en tant qu'agent de conservation naturel qui a inhibé la croissance des micro-organismes psychotrophes. Cette étude est similaire aux travaux réalisés par Abdel-hamied *et al.*(2009) ont montré que une inhibition des microorganismes psychotrophes dans la viande hachée conservée à 4 ° C par des extraits de *rosmarinus officinalis* et de *salvia officinalis*.

4.5.3. pH

Les résultats de suivi de l'évolution du pH au cours du temps, présentés dans la figure 16 a révélé que le pH du lait cru traité a diminué progressivement au cours du temps. Cependant le pH du lait traité avec les différentes concentrations de l'huile a montré une augmentation du pH du J0 à J3, puis une diminution dans le reste des jours de conservation. Le pH de témoin a été révélé plus acide que celui du lait traité.

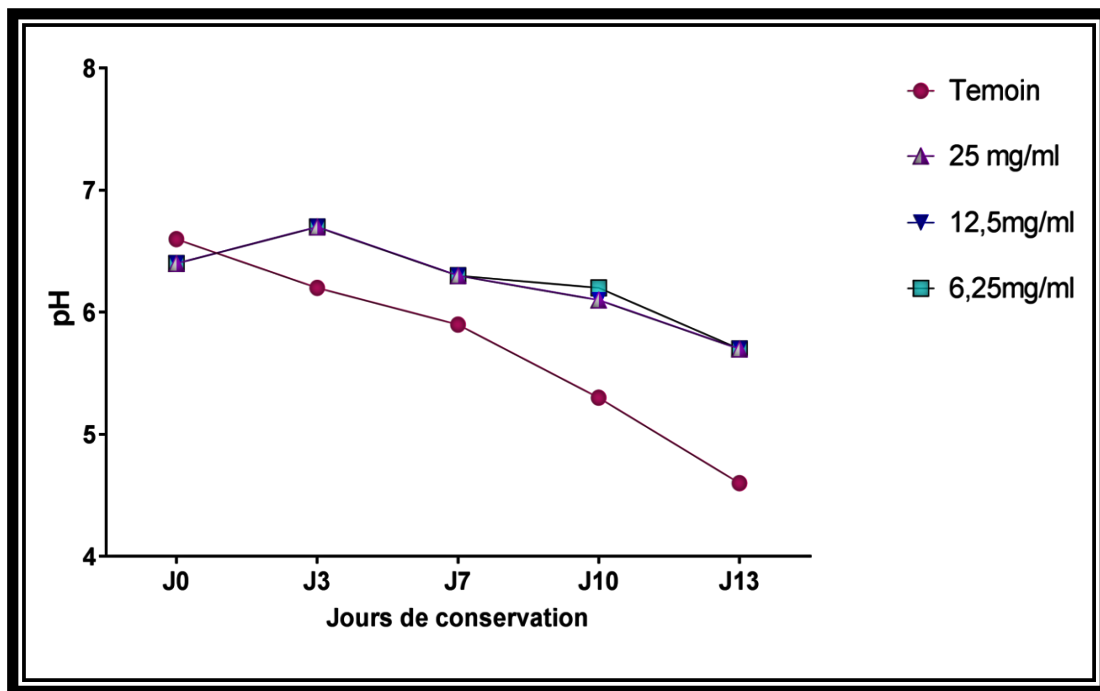


Figure 16. Suivi de l'évolution du pH au cours du temps.

4.5.4. Acidité

La figure 17 représente les résultats du suivi de l'évolution de l'acidité titrable au cours du temps. Les valeurs du témoin ont représenté une augmentation progressive pendant tout les jours de conservation. En revanche le lait traité avec l'huile a révélé une stabilité durant les jours J0 à J3, puis une augmentation dans le reste des jours de conservation. Les valeurs de l'acidité du lait traité sont inférieure aux ceux du lait non traité.

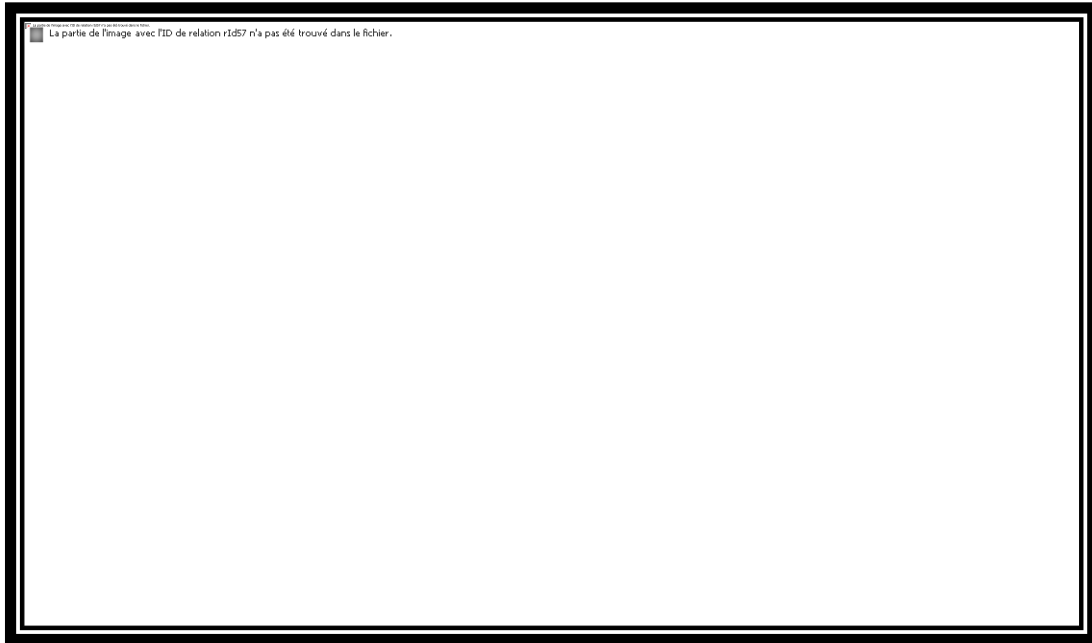


Figure 17. Suivi de l'évolution de l'acidité au cours du temps.

Les valeurs de l'acidité titrable et de pH du témoin et du lait traité dépendent selon la teneur en caséine, en sels minéraux et en ions (Alain, 1984), des conditions hygiéniques lors de la traite, de la flore microbienne totale et son activité métabolique (Mathieu, 2004).

Conclusion

Conclusion

Plusieurs travaux de recherche ont été concentrés sur les huiles essentielles extraites des plantes aromatiques. Les différents résultats publiés indiquent qu'elles sont douées de plusieurs propriétés biologiques.

Nous rappelons que les objectifs de notre étude sont la valorisation de feuille d'*Artemisia herba alba* par l'utilisation ces extraits (huile, éthanolique, aqueux) comme agent antibactérien, et en particulier l'utilisation de différents concentration d'huile essentielle comme bioconservateur dans le lait cru. Au cours de notre travail, nous avons pu dégager les conclusions suivantes :

Les résultats de l'étude d'extraction montrent que le rendement d'extraction le plus élevé a été obtenu par macération dans l'éthanol.

L'étude quantitative a révélé que cette plante est riche en polyphénols et flavonoïdes dans l'extrait éthanolique.

Pour l'activité antibactérienne *in vitro*, la méthode de l'aromatogramme et la méthode de dilution en bouillon nous avons permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien de l'huile essentielle et l'extrait éthanolique et aqueux d'*Artemisia herba alba* vis-à-vis des bactéries. Ce pouvoir diffère d'un extrait à l'autre. Les résultats obtenus indiquent que la bactérie *Pseudomonase aeruginosa* est résistante vis-à-vis tous les extraits testé.

Tandis que l'extrait aqueux il n'avait d'effet bactéricide contre les bactéries testé

Concernant la bioconservation de lait cru à base de différentes concentrations d'huile d'*Artemisia herba alba* : 6.25 ,12.5 ,25 mg/ml, Les résultats d'analyses physico-chimiques et microbiologiques effectuées sur le lait cru, révèlent que le lait cru traité c'est mieux que le témoin.

Dans le but de compléter ce travail, il serait intéressant de :

-Utilisation faible concentration d'huile d'*Artemisia herba alba* que celles utilisé dans ce travail pour obtenir des résultats plus efficaces.

-Purification et identification via des études photochimiques spectrales des extraits obtenus d'*Artemisia herba alba* afin d'isoler les molécules responsables des activités antibactériennes et appliquer dans l'industrie agro-alimentaire pour réduire les impacts indésirables et prolonger la durée de conservation.

Références bibliographiques

-A-

Abdel-Hamied A. A., Nassa A.G.,El-Badry N.2009. Investigations on antioxidant and antibacterial activities of some natural extracts. World Dairy Food Sci. 4:1-7.

Aby B. 2008. Contribution à l'étude du lait et les produits laitiers importés au Sénégal : Etude économiques et qualité hygiéniques. Thèse de doctorat d'états, université Cheikh Anta Diop, Dakar, 97 p.

AFNOR, 1986. Association française de normalisation, Paris, 139-14.

Alais C. 1984. La micelle de caséine et la coagulation du lait. In Science du lait : Principes des techniques laitières. 4ème éd, Ed. Sepaic, Paris, pp. 723-764.

Akrout A. 2014. Etude des huiles essentielles de quelques plantes pastorales de la région de Matmata, Tunisie. Cahiers Options Méditerranéennes 62 :289-292.

Anonyme. 1999. Codex alimentaires: Dispositions générales. 2^{ème} édition, Rome, Italie, p 397.

Aouadhi S. 2010. Etude de 57 plantes recommandées par les herboristes. Mémoire de Master spécialisé en toxicologie, faculté de médecine, Tunis, p 191.

Awad Wa.,Ghareeb K.,Abedl-Raheem S.,Bohm J.2009.Effect of dietary inclusion of probiotic and synbiotic on growth performance, organ weights, and intestinal histomorphology of broiler chickens.Veterinary 88(1) :49-59.

-B-

Baba Aissa F. 2000. Encyclopédie des plantes utiles. Flore d'Algérie et du Maghreb. Substances végétales d'Afrique, d'Orient et d'Occident. Edition librairie moderne, Rouïba.

Babayi H.,Kolo I.,Okogum J.I. 2004 .The antimicrobial activities of methanolic extracts of *Eucalyptus camaldulensis* and *Terminalia catappa* against some pathogenic microorganisms. Biochemistri 16 (2): 102-5.

Bahorun T., Grinier B., Trotin F., Brunet G., Pin T., Luncky M., Vasseur J., Cazin M., Cazin C. and Pinkas M. 1996. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. Arzneimittel-Forschung, 46(11): 1086-1089.

Bendjilali B., Richard H., Liddle P. 1984. Chémotypes d'arnoise blanche du Maroc, congrès international de la société italienne de phyto-chimie, 131-151 p.

Benhedane B N. 2012. Qualité microbiologiques du lait cru destiné à la fabrication d'un type de camembert dans une unité de l'est Algérien. Thèse de magistère en Biotechnologie Alimentaire, université Mentouri, Constantine, 71 p.

Bornert G. (2000). Importance des bactéries psychrotrophes en hygiène des denrées alimentaires. Revue Méd. Vétérinaire 151 (11) : 1003-1010.

Boubezari M T. 2010. Contribution à l'étude des caractéristiques physicochimiques et mycologiques du lait chez quelques races bovines, ovines et caprines dans quelques élevages de la région de Jijel. Thèse de magister en médecine vétérinaire, université Mentouri, Constantine, 103 p.

Boudjelal A., Henchiri C., Siracusa L., Sari M., Ruberto G. 2015. Compositional analysis and *in vivo* anti-diabetic activity of wild Algerian *Marrubium vulgare* L. infusion. Biomolecular. chemistry 83:286–292.

Boudjouref M. 2011. Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris* L. Thèse de magistère, Biochimie appliquée, 64 p.

Bourgeois C. M., Mescle, J. F., Zucca, J. 1996. Microbiologie alimentaire: Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Tome 2-Aliments fermentés et fermentations alimentaires. Tec & Doc Lavoisier

Bouyahya A., Bakri Y., Et-Touys A., Talbaoui A., Khouchlaa A., Charfi S., & Dakka, N. 2017. Résistance aux antibiotiques et mécanismes d'action des huiles essentielles contre les bactéries. Phytothérapie 1-11.

Brisabois A., Lafarge V., Brouillard A., Buyser M. L., Collette C., Garin-Bastuji B., Thorel M.F. 1997. Les germes pathogènes dans le lait et les produits laitiers: situation en France et en Europe. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 16 (1) : 452-471.

Bruneton J. 1999. Pharmacognosie- photochimie, plantes médicinales, 3^{ème} édition. Ed. Tec et Doc Lavoisier, Paris.

-C-

Calsamiglia S., Busquet M., Cardozo P W., Castillejos L., Ferret A. 2007.

Invited review : Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. Journal of Dairy Science. 90, 2580-259.

CASFM. 2018. Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.

Chaabna N. 2014. Activité anticoccidienne des extraits d'*Artemisia herba alba*. Thèse de magistère, valorisation des ressources végétales 61 p.

Charpentier B., Hamon-Loreleac F., Halay A., Huard A & Ridoux L. 2008. Guide du préparateur en pharmacie, 3ème édition, Elsevier Masson, 1358,2008.1012 p.

Conte S. 2008. Evolution des caractéristiques organoleptiques, physicochimiques et microbiologiques du lait caillé traditionnel. Thèse de magister en médecine vétérinaire, université Cheikh Anta Diop, Senegal, 28 p.

Couic-Marinier F., Lobstein A. 2013. Les huiles essentielles gagnent du terrain à l'officine. Actualités pharmaceutiques. N° 525

Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C., Gustafson J.E., Warmington J.R., Wyllie S.G. 2000. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). Journal of Applied Microbiology, 88: 170–175.

-D-

Dadi P.K. Ahmad M. Ahmad Z. 2009. Inhibition of ATPase activity of *Escherichia coli* ATP synthase by polyphenols. Int J Biol Macromol 45 (1): 72-9.

-E-

Essawi T. et Srour M. 2000. Screening of some palestinian medicinal plants for antibacterial activity. Journal of Ethnopharmacology, 70: 343-349.

El kalamouni C., Raynaud C., Talout T. 2010. Design of an Artificial Crushing Finger Device for Rapid Evaluation of Essential Oils from Aromatic plants leaves. Expression of Multidisciplinary Flavour Science, Ed. Imre Blank, Matthias Wüst, Chahan Yeretizian: 525-528.

Elmer H M .et James S. 2001. Applied dairy microbiology. 2ème édition, New York, America. P 736.

-F-

FAO. Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. 1998. Collection FAO alimentation et nutrition. N°28.

-G-

Geneviève L. 2007. Évaluation de la qualité du lait et de la santé du troupeau laitier en régie biologique. Thèse de magistère, Ministère de l'Agriculture, 33 p.

Ghanmi M., Satrani B., Aafi A., Isamili M R., Houti H., El Monfalouti H., Benchakroun K H., Aberchane M., Harki L., Boukir A., Chaouch A., Charrouf Z. 2010. Effet de la date de récolte sur le rendement, la composition chimique et la bioactivité des huiles essentielles de l'armoise blanche (*Artemisia herba-alba*) de la région de Guerçif (Maroc oriental). *Ecologie* 8: 295–301.

Ghaouses S .2011. Evaluation de la qualité physico-chimique et organoleptique de cinq marques de laits reconstitués partiellement écrémés commercialisés dans l'est Algérien. Thèse de magistère en Sciences Alimentaires, université Mentouri, Constantine, 130 p.

Ghedadba N., Bousselsela H., Hambaba L., Benbia S., Mouloud Y. 2014. Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des feuilles et des sommités fleuries de *Marrubium vulgare* L. *Phytothérapie* 12: 15-24.

Ghrabi Z. S., 2005. A Guide to Medicinal Plants in North Africa. IUCN Centre for Mediterranean Cooperation, Malaga, Spain. P43.

Ghrabi Z. and Sand R.L. 2008. *Artemisia herba alba* Asso. A Guide to Medicinal Plants in North Africa, pp 19 - 49.

Goetz P et Ghedira K. 2012. *Phytothérapie anti-infectieuse*. Edition: Springer-Verlag France, Paris. pp 4-194.

Goudjil, M. B., Ladjel, S., Bencheikh, S. E., Zighmi, S., & Hamada, D. 2015. Chemical compound profile, antibacterial and antioxidant activities of the essential oil extracted from the *Artemisia herba-alba* of Southern Algeria. *Int. J. Biol. Chemistry* 9 : 70-78.

Guiraud J .P. 2003. *Microbiologie alimentaire*. Eds. Dunod, Paris, p 395.

Gullulce M., Sökmen M., Daferera D., Açar, G., Özkan, H., Kartal, N., Şahin, F. 2003. In *vitro* antibacterial, antifungal, and antioxidant activities of the essential oil and methanol

extracts of herbal parts and callus cultures of *Satureja hortensis* L. Chemistry 51(14): 3958-3965.

-H-

Har T. and Shears P. 1997. Atlas de Poche de Microbiologie, Flammarion Medecine-Sciences : Atlas de Poche de Microbiologie. Bukupedia.

-I-

Ismaili R., Lamiri K., Moustaid A. 2014. Study of antibacterial activity of essential Oils of three aromatic and medicinal plants. International Journal of engineering research & technology 8: 1247- 1251.

Ismaili, R., Lamiri, A., & Moustaid, K. 2016. Study of anti-eczema activity of essentials oils of *Thymus vulgaris*, *Citrus limonum* and *Mentha spicata* from Morocco. *International Journal of Innovation and Applied Studies* 14 (1): 113.

- K-

Kalembe D.,Kunicka A. 2003.Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Current Medicinal Chemistry 10: 813-829.

Kahlmeter G et Turnidge J D.2012.Reviving old antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(8), 2177-2181.

Kahlouche R F. 2014. Evaluation chimique et activité antibactérienne de quelques plantes médicinales d'Algérie. Thèse de doctorat en sciences, université de Constantine 1, Constantine ,111 p.

Kheyar N., Meridja D., & Belhamel K. 2014. Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Inula viscosa*, *Salvia officinalis* et *Laurus nobilis* de la région de Bejaia. *Natural Product* 2 (1) 18-26.

Kizi N., Makdoud S. 2014. Analyses physico-chimiques et microbiologiques du lait cru collecter au niveau de deux régions Akbou et Sidi Aich (Bejaia). Thèse d'ingénieur d'Etat en Génie Biologique, Université Abderrahmane Mira, Bejaia, 36 p.

-L-

Labioui H., Laarousi E., Benzakour A., El yachioui M., Berny E., Ouhssine M. 2009.Etude physicochimiques et microbiologiques du lait cru. *Pharmacologie* 148 : 7-16.

-M-

Marcel M. 2002. Larousse agricole : dictionnaire. 4^{ème} édition, Amazon, France, p 766.

Martial A. 2012. Les dernières avancées pour la détection des *Salmonelles* dans les aliments.

Mathieu J. 1998. "Initiation à la physicochimie du lait", Lavoisier, « Tec et Doc », Paris, p. 220.

Messai L. 2011. Etude phytochimique d'une plante médicinale de l'Est algérien (*Artemisia herba alba*). Thèse de Doctorat, Constantine. p 95.

Mirjalili M.H., Tabatabaei S.M.F., Hadian J., Nejad S.E., Sonboli A.2007. Phenological variation of the essential oil of *Artemisia scoparia* from Iran. *Essent.oilRes* 19: 326–329.

Mouna M.2015. Activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Ecalyptus camendulensis*, Thèse de doctorat, université Kasdi Merbah, Ouargla.

Moutachakir. M., Chinbo. M., Elkhoudri. N., Soraa.N. 2015. La résistance aux antibiotiques chez les entérobactéries uropathogènes en milieu pédiatrique au CHU de Marrakech. *Journal de pédiatrie et de puériculture* 28(1) : 16-22.

Moro Buronzo A.2008. Grand guide de l'huile essentielle, hachette pratique, France,p 23.

Muthu C., Ayyanar M.,Raja N., Ignacimuthu S. 2006. Medicinal plants used by traditional healers in Kancheepuram District of Tamil Nadu, India.*Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 2: 43.

-N-

Nabli M. A.1989. Essai de synthèse sur la végétation et la phyto-écologie. Tunisiennes, tome I. Ed. MAB, Faculté des sciences de Tunis, pp 186-188.

-O-

O.M.S. 2002. Organisation Mondiale de la santé (OMS) Rapport sur la médecine traditionnelle : Besoins et potentiel. N° 4. 6 p.

-P-

Ponce A G., Fritz R., Del Valle C., Roura S. I. 2003. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT-Food Science and Technology* 36(7) : 679-684.

Pougheon S. 2001. Contribution à l'étude des variations de la composition du lait et ces conséquences en technologie laitière. Thèse de doctorat d'états en médecine vétérinaire, université Paul-Sabatier Toulouse, France, 96 p.

-Q-

Quezel P. et Santa S. 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions méridionales. Tome 2. édition, CNRS Paris ,1170 p.

-R-

Reynal B. et Mesclé J F. 2009. Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaire : dictionnaire. 4^{ème} édition, Lavoisier, Paris, p 736.

Ribéreau-Gayon P. 1968. Notions générales sur les composés phénoliques : les composés phénoliques des végétaux. Edition dunod, Paris, P 1-27.

Richter G. 1993. Métabolisme des végétaux. Physiologie et Biochimie. Ed. Presses Polytechniques et Universitaire Romandes, 322-323.

-S-

Sangwan N. S., Farooqi A. H., Shabih F., Sangwan R.. S., 2001. Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation* 34, pp 3-21.

Sell S. 2006. *The Chemistry of Fragrance. From perfumer to Consumer.* 2^{ème} édition, The Royal Society of Chemistry. Cambridge. p329.

Selim, S. 2011. Antimicrobial activity of essential oils against vancomycin-resistant enterococci and *Escherichia coli* o157:h7 in feta soft cheese and minced beef meat. *Brazilian Journal of Microbiology* 42: 187–196.

Singleton V., Rossi J. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144-158 p.

-T-

Talbi H; Boumaza A., El-mostafa K., Talbi J., Hilali A. 2015. Evaluation of antioxidant activity and physicochemical composition of methanolic and aqueous extracts of *Nigella sativa* L. 4: 1111-1117p.

Tastekin D., Atasever M., Adigüzel G., Keles M., Tastekin A. 2006. Hypoglycaemic effect of *Artemisia herba-alba* in experimental hyperglycaemic rats. Bull Vet Inst Pulawy 50: 235-238.

-V-

Veisseyre R. 1975. Technologie du lait constitution, récolte, traitement et transformation du lait. 3^{ème} édition. Edition la maison rustique, Paris.

Vignola C. 2002. Science et Technologie du Lait Transformation du Lait. Edition Presses Internationales Polytechniques, Canada. pp 3-75.

-Y-

Yin Y., Gong F.Y., XinWu X., Sun Y., Li Y., Chen T., Xu Q. 2008. Antiinflammatory and immunosuppressive effect of flavones isolated from *Artemisia vestita*. Ethnopharmacol 120: 1–6.

Yobouet B A. 2016. Contamination du lait cru et de l'attiéké vendus sur les marchés informels à Abidjan (Côte d'Ivoire) par le groupe *Bacillus cereus* et analyse des risque. Thèse de doctorat d'états, université Nangui Abrogoua, Abidjan, 218 p.

Younsi F., Trimech R., Boulila A., Ezzine O., Dhahri S., Boussaid M., Messaoud C. 2016. Essential oil and phenolic compound of *Artemisia herba-alba* (Asso.): Composition, antioxidant, antiacetylcholinesterase, and antibacterial activities. International journal of food properties, 19(7) :1425-1438.

Annexe 1

Annexe 1 Composition des principaux milieux de cultures utilisés

Milieux liquides

Eau physiologique stérile : Composition en g/l :

Chlorure de sodium (Na Cl).....9g

Eau distillé.....1000ml

PH=7

Stérilisation 121C°/ 15 min

Bouillon Muller Hinton : Composition en g/l

Extrait de viande : 2,0.

Hydrolysate acide de caséine : 17,5.

Amidon soluble : 1,5.

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

Milieux solides

Gélose Muller Hinton (M-H) : Composition en g/l:

Extrait de viande.....3g

Hydrolysate acide de caséine.....17.5g

Agar.....18g

PH= 7.4 Stérilisation à 121 C°/ 15 min

Gélose nutritif (GN) : Composition en g/l :

Peptone.....10g

Extrait de viande.....3g

Extrait de levures.....3g

Chlorure de sodium.....5g

Agar.....18g

PH= 7.3±0.2

Stérilisation à 121°C/15 min

Plate Count Agar (PCA):

Tryptone	5g
Extrait autolytique de levure.....	2.5g
Glucose.....	1g
Agar bactériologique.....	12g

Autoclave pendant 15 min à 121°C

pH=7

Annexe 2 acidité titrable

- Solution de la soude à 0.1 N

- (NaOH).....2 g.

-Eau distillé.....500 ml.

Annexe 3 Polyphénols totaux

Solutions de travail

- Folin-Ciocalteu dilué

1ml du réactif dans une fiole gaugé de 10 ml et compléter au traits de gauge avec l'eau distillée.

- Na₂CO₃ a 7.5%

7.5 g dans 100 ml d'eau distillée.

- Solution d'extrait à 1 mg/ml

5mg dans 5 ml d'éthanol.

- L'acide gallique

2.5 mg dans 10ml de éthanol.

Annexe 4 flavonoïdes

Solutions de travail

- (AlCl₃) à 2%

2 g dans 100ml d'eau distillée.

- Solution d'extrait à 1 mg/ml

5mg dans 5 ml d'éthanol.

- la quercitrine

4 mg dans 10ml d'éthanol.

Annexe 5 principales matériels et produits utilisés :

Matériels et appareillages	Milieux de culture	Solvants et réactif utilisés
Autoclave	BMH	Eau distillé
Rotavapor		
Burette à robinet	Gélose nutritif (GN)	Eau physiologique
Etuve		
Agitateur	PCA	DMSO 10%
plaque-chauffante		
Vortex	Gélose MH	Éthanol
Réfrigérateur		
Bec bunsen		Folin–Ciocalteu
Tubes à essai		chlorure d'aluminium
Boîtes de Pétri		(AlCl ₃)
Ecouvillons		la solution de la soude à 0.1 N
Micropipettes		phénol phtaléine 1 %
Disques		
Papiers Wattman		
Burette à robinet		
Pipettes pasteur		
Anses de platine		
Pince		
Instrument pied à coulisse		
Spatule		
Becher- Celvenger		
Erlenmeyer		
Papier filtre		
pH-mètre		
Spectrophotométrie-		

Annexe 6 tableau dénombrement du FTAM dans le témoin et le lait traité par différente concentration

JOURS	Nombre de colonies (UFC/ml)			
	Témoin	25 mg/ml	12,5mg/ml	6,25mg/ml
J0	59,50 ×10 ²	30,5×10 ²	34,5×10 ²	38×10 ²
J3	62×10 ²	129,5	118,5	79,5
J7	207,5	0	0	0
J10	189	0	0	0
J15	123	0	0	0

Annexe 7 tableau dénombrement de la flore totale dans le témoin et le lait traité par différente concentration (log UFC /ml).

X=Log (x)				
Jours	Témoin	25 mg/ml	12,5mg/ml	6,25mg/ml
J0	3,77	3,48	3,53	3,57
J3	3,79	2,11	2,07	1,90
J7	2,32	0	0	0
J10	2,28	0	0	0
J13	2,09	0	0	0

Annexe 8 tableau dénombrement du psychrotrophe dans le témoin et le lait traité par différente concentration.

JOURS	Nombre de colonies (UFC/ml)			
	Témoin	25 mg/ml	12,5mg/ml	6,25mg/ml
J0	63 ×10 ²	129,5	186	210,5
J3	270,5×10 ²	145	195,5	221,5
J7	89 ×10 ³	146	196,5	223,5
J10	158,5 ×10 ³	149	200	235
J13	185,5 ×10 ³	149	201	238

Annexe 9 tableau dénombrement du psychrotrophe dans le témoin et le lait traité par différente concentration (logUFC /ml)).

x=Log (x)	X=Log (x)			
Jours	Témoin	25 mg/ml	12,5mg/ml	6,25mg/ml
J0	3,79	2,11	2,26	2,32
J3	4,43	2,16	2,29	2,34
J7	4,94	2,16	2,29	2,349
J10	5,20	2,17	2,30	2,37
J13	5,26834391	2,17318627	2,30319606	2,37657696

Annexe 10 tableau l'évolution du pH dans le témoin et le lait traité par différente concentration. .

Jours	PH			
	Témoin	25 mg/ml	12,5mg/ml	6,25mg/ml
J0	6,6	6,4	6,4	6,4
J3	6,2	6,7	6,7	6,7
J7	5,9	6,3	6,3	6,3
J10	5,3	6,1	6,1	6,2
J13	4,6	5,7	5,7	5,7

Annexe 11 tableau l'évolution de l'acidité (°Dornic) dans le témoin et le lait traité par différente concentration.

Jours	Acidité (°Dornic)			
	Témoin	25 mg/ml	12,5mg/ml	6,25mg/ml
J0	18	18	18	18
J3	22	18	18	16
J7	26	22	22	22
J10	38	26	26	24
J13	50	30	30	28

ملخص

الهدف من عملنا هو تسليط الضوء على النشاط المضاد للبكتيريا لمختلف مستخلصات *Artemisia herba alb*: الزيت ، والإيثانول والمستخلص المائي التي تم حصادها من القنطرة بولاية بسكرة . واستخدام زيتها في عملية الحفظ الحيوي لحليب البقر الخام. تم الكشف عن أعلى عائد استخلاص في مستخلص الإيثانول بقيمة 15.64%. حيث أظهرت الدراسة الكمية ثراء في البوليفينول والفلافونويد في المستخلص الإيثانولي. من ناحية أخرى أظهرت تقنية aromatoqramme والتخفيفات في الوسط السائل نشاطاً قوياً للمستخلصات المختلفة ضد بكتريا *S. aureus* و *E. coli* و *Salmonella sp* ، بينما كانت *P. aeruginosa* مقاومة. تكشف نتائج التحليلات الميكروبيولوجية التي أجريت على الحليب عن فعالية الزيت في مقاومة البكتيريا psychrotrophe التي تسبب انخفاض في جودة الحليب و تؤدي إلى ظهور تغيرات خطيرة بما في ذلك النكهات التي تجعل المنتجات غير قابلة للاستهلاك.

الكلمات المفتاحية : الشيح ، النشاط المضاد للبكتيريا ، الحفظ الحيوي ، الحليب.

Résumé

L'objectif de notre travail est de mettre en évidence l'activité antibactérienne des différents extraits d'*Artemisia herba alba* : huile, extrait éthanolique et aqueux récoltées à El Kantara wilaya de Biskra. Et l'utilisation de leur huile dans le processus de la bioconservation du lait cru de vache. Le rendement d'extraction le plus élevée a été révélé dans l'extrait éthanolique avec une valeur de 15.64%. Ainsi l'étude quantitative a montré une richesse en polyphénol et en flavonoïde des extraits surtout en extrait éthanolique. D'autre part la méthode de l'aromatogramme et celle des dilutions en milieu liquide montre une forte activité antibactérienne des différents extraits vis-à-vis des bactéries *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella sp*, tandis que *P. aeruginosa* s'est révélé résistante. Les résultats d'analyses microbiologiques effectuées sur le lait révèlent l'efficacité de l'huile contre les bactéries psychrotrophes qui diminué la qualité du lait et conduit à l'apparition de défauts graves notamment de saveurs qui rendant les produits inconsommables.

Mots clés : *Artemisia herba alba*, activité antibactérienne, bioconservation, le lait.

Abstract

The objective of our work is to highlight the antibacterial activity of the various extracts of *Artemisia herba alba*: oil, ethanolic and aqueous extract harvested at El Kantra wilaya of Biskra. And the use of their oil in the process of bio conservation of raw cow milk. The highest extraction yield was revealed in the ethanolic extract with a value of 15.64%. Thus the quantitative study showed richness in polyphenol and flavonoid extracts mostly ethanolic extract. On the other hand the method aromatoqram and dilutions in liquid medium showed strong antibacterial activity of the different extracts against *S. aureus*, *E. coli* and *Salmonella sp* bacteria, while *P. aeruginosa* was resistant. The results of microbiological analyzes performed on the milk reveal the effectiveness of the oil against psychrotrophic bacteria which decreased the quality of the milk and led to the appearance of serious defects including flavors that make the products unpalatable.

Key words: *Artemisia herba alba*, antibacterial activity, bioconservation, milk.