

N° Ordre...../Faculté/UMBB/2018

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE M'HAMED BOUGARA- BOUMERDES



Faculté des Sciences

Thèse de Doctorat

Présenté par

M^{me} BOUMAZA Sarah

Filière : Biologie

Option : Ecologie des Systèmes Vectoriels

Evaluation de l'effet des extraits flavonoïques et des huiles essentielles d'*Euphorbia guyoniana* sur les bactéries pathogènes d'origine tellurique.

Devant le jury :

M ^{me} GANA-KEBBOUCHE	Salima	Prof	UMBB	Présidente
M ^{me} NATECHE-METIAZ	Farida	Prof	USTHB	Examinatrice
M ^{me} BISSAAD	Fatma	Prof	UMBB	Examinatrice
M ^{me} OULEBSIR-MOHAND KACI	Hakima	MCA	UMBB	Examinatrice
M ^{me} AIT SLIMANE-AIT KAKI	Sabrina	MCA	UMBB	Examinatrice
M ^r ARAB	Karim	Prof	UMBB	Directeur de thèse

Année universitaire : 2018/2019

Résumé

L'Euphorbe de Guyon, *Euphorbia guyoniana* Boiss, est une plante endémique de l'Algérie et utilisée en médecine traditionnelle. Afin d'apporter les preuves de son innocuité et de valoriser ses vertus, une étude phytochimique et une évaluation de l'effet de l'extrait aqueux et des huiles essentielles sur des bactéries pathogène isolées et identifiées de différents sols ont été réalisées.

L'étude phytochimique a révélée une forte teneur en saponosides, alcaloïdes, lipoides, glucosides, sucres réducteurs et une teneur moyenne en tannins totaux, coumarines, flavonoïdes, mucilages, polyphénols. L'analyse de l'extrait aqueux par HPLC, a dévoilé la présence de 41 composés flavonoïques, dont 27 ont pu être identifiés. En revanche l'analyse par GC-MS des huiles essentielle de la même plante n'a révélé que la présence d'un seul composé faisant partie des constituants du latex.

L'activité antibactérienne a été testée sur seize espèces bactériennes isolées à partir d'un sol d'écurie, de culture de pomme de terre et de poulailler, et identifiées par des galeries biochimiques et par VITEK. Au total (77) bactéries réparties en six familles ont été identifiées: *Staphylococcaceae* (09), *Enterobacteriaceae* (44), *Streptococcaceae* (05), *Pseudomonadaceae* (10), *Moraxellaceae* (05) et *Enterococcaceae* (04). Le test antibactérien a été réalisé selon la méthode de diffusion sur milieu solide. Les deux extraits ont présenté une bonne activité antimicrobienne. Les CMI obtenues avec l'extrait aqueux flavonoidique varient de 0,07mg/ml pour *Pseudomonas aeruginosa* à 61,78mg/ml pour d'*Escherichia coli*. Ainsi, en conclusion l'extrait aqueux flavonoïque et l'huile essentielle d'*Euphorbia guyoniana* peuvent constituer une alternative au contrôle chimique de certaines bactéries pathogènes.

Mots clés : Activité antibactérienne, bactéries pathogènes, *Euphorbia guyoniana*, flavonoïdes, huiles essentielles, sol, VITEK.

Remerciements

Avant toute chose, je remercie DIEU le tout puissant de m'avoir illuminé la voix du savoir et donné la force et la patience, le courage et la volonté pour accomplir ce modeste travail.

J'adresse tout d'abord mes sincères remerciements à mon directeur de thèse P^r Arab Karim qui m'a fait bénéficier de ses connaissances et de son expérience, ses conseils, sa compréhension, sa gentillesse, sa sympathie, ses encouragements et son aide. Merci d'avoir accepté de diriger ce travail. Merci pour votre encadrement sans faille tout au long de ces années.

Je remercie vivement M^{me} KEBBOUCHE-GANA Salima, d'avoir accepté de présider ce travail. Soyez assuré, madame la présidente, de mes sentiments respectueux et de ma sincère reconnaissance.

Je tiens à remercier M^{me} NATECHE-METIAZ Farida, M^{me} OULEBSIR-MOHAND KACI Hakima, M^{me} AIT SLIMANE-AITKAKI Sabrina et M^{me} BISSAAD Fatma qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail en tant qu'examinatrices de thèse.

J'exprime mes plus vifs remerciements, et ma reconnaissance toute particulière et gratitude à M^{me} ARAB-BOUCHENAK Ouahiba maître de conférence A à l'Université de Boumerdès et M^{me} AICHAOUI-YAHIAOUI Karima maître de conférence A à l'Université de Boumerdès, pour l'aide précieuse et chaleureuse qu'elles m'ont apportées. Vous avez su faire partager votre expérience et vous m'avez guidé dans le monde de la recherche scientifique.

Je tiens à exprimer ma très grande considération, et mon profond respect à monsieur le directeur de la santé de la Wilaya de Boumerdès, Dr HADDAD F, et à tout le personnel du laboratoire d'hygiène de la Wilaya de m'avoir toujours encouragé, pour votre présence, malgré vos responsabilités et nombreuses occupations. Vous trouverez ici l'expression de mon respect le plus profond.

Un grand merci à monsieur HAMLADJI Smail, directeur commercial de l'Entreprise National des Arts Graphiques (ENAG) qui a pris en charge l'impression de cette thèse... Merci

En fin, je remercie toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin, directement ou indirectement dans la préparation de ce modeste travail.

Dédicaces

*Aux trois hommes de ma vie : PAPA, KHALIS, et
AREZKI...*

*A mon mari Arezki, merci de supporter mon caractère
«tendre et facile » surtout ces derniers mois, et d'accepter
mes décisions parfois un peu égoïstes...*

*Au rayon de soleil qui illumine ma vie depuis 15 mois déjà, à
ma fille, mon bonheur, mon trésor YASMINE*

Aux deux braves femmes, DIDA et MAMAN...

*A mes beaux parents, aimables et gentils, ma belle sœur et
mon beau frère...*

A ma petite sœur Maria...

*A tous ceux qui ne sont plus parmi nous, mais
« omniprésents » dans nos cœurs : MAMA, MANEL,
DJEDDIS, YEYES, et TONTON...*

*A SAMIR, mes adorables TATA ; OUIZA et SOUSSA... je
vous adore.*

*A HANENE, merci d'être toujours là, tu es unique...
Merci à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce
travail, je m'adresse particulièrement à vous; NARIMEN,
SOUHILA, DJILLALI, NINA.*

SARAH

Liste des abréviations

ADH : Arginine Dihydrolase

ADN : Acide Désoxyribose Nucléique

AFNOR : Association Française de Normalisation

Al : Aluminium

AlCl₃ : Trichlorure d'Aluminium

ATP : Adénosine TriPhosphate

BEA: Bile Esculine Azide

Cit : Citrate

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CuSO₄ : Sulfate de cuivre

DMSO : diméthylsulfoxyde

E. coli : Escherichia coli.

ENSA : Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie

EA : Extrait Aqueux

EAE : Extrait d'Acétate d'Ethyle

EB : Extrait Butanolique

EED : Extrait d'Ether Diéthylique

ESM : Erreur Standard à la Moyenne

FeCl₃ : Chlorure de ferrique.

GC-EIMS : Gas Chromatograph Electron Impact Mass Spectrometer

GC-SM : Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse

Glu : Glucose

HCl : Acide chlorhydrique

HE : Huile essentielle

HPLC: Chromatographie Liquide à Haute Performance

H₂O₂ : Eau oxygénée

H₂SO₄ : Acide Sulfurique

H₂S : Thiosulfate de sodium

I₂ : Iode

IR : Infrarouge

KOH : Hydroxyde de potassium

Lac : Lactose

LDC : lysine décarboxylase

Liste des abréviations

Mg : magnésium

mg EQ/g : milligramme d'équivalent de quercétine par gramme

Mob: Mobilité

N: Azote

NaOH : Hydroxyde de sodium

NCCLS : National des Normes du Laboratoire Clinique

NR : Nitrate Réductase

ODC : Ornithine Decarboxylase

P. aeruginosa : Pseudomonas aeruginosa

R : Résistant

R_t : Temps de rétention

Sac : Saccharose

S. aureus : Staphylococcus aureus

S : Sensible

TSI : Triple sugar iron

V/V : Volume par volume

VP-RM : Voges-Proskauer-Rouge Méthyle

UV : Rayonnement Ultra-Violet

Liste des figures

Figure 1 : photos (a, b, c) d' <i>Euphorbia guyoniana</i> Boiss. & Reut.	5
Figure 2 : carte de répartition géographique d' <i>Euphorbia guyoniana</i> en Algérie.....	7
Figure 3 : étape initiale de la formation des flavonoïdes	11
Figure 4 : schéma simplifié de la biosynthèse de différentes classes de flavonoïdes.....	12
Figure 5 : squelette de base des flavonoïdes	13
Figure 6 : schéma des différentes classes des flavonoïdes	13
Figure 7 : structure des différents types de flavonoïdes	14
Figure 8 : cellule à huile essentielle.....	18
Figure 9 : photo d'une <i>salmonella spp</i> sous microscope photonique (Gr 100).....	23
Figure 10: photo d'une <i>Listeria monocytogenes</i> sous microscope photonique (Gr 100).....	24
Figure 11 : photo d'une <i>Escherichia coli</i> sous microscope photonique (Gr 100).....	26
Figure 12 : photo d'une <i>Enterococcus faecalis</i> sous microscope photonique (Gr 100).....	28
Figure 13 : photo d'une <i>Bacillus cereus</i> sous microscope photonique (Gr 100).....	29
Figure 14 : photo d'une <i>Clostridium botulinum</i> sous microscope photonique (Gr 100).....	30
Figure 15 : photo d'une <i>Pseudomona aeruginosa</i> sous microscope photonique (Gr 100).....	31
Figure 16 : photo d'une <i>Erwinia carotovora</i> sous microscope photonique (Gr 100).....	33
Figure 17 : photo d'une <i>Agrobacterium tumefaciens</i> sous microscope électronique.....	34
Figure 18 : zone de récolte de la plante <i>Euphorbia guyoniana</i> (Ghardaia)	44
Figure 19: protocole d'extraction des flavonoïdes de la plante <i>Euphorbia guyoniana</i>	49
Figure 20 : dispositif d'hydrodistillation.....	52
Figure 21 : méthode d'échantillonnage en « zigzag »	55
Figure 22 : concentration des fractions flavonoïques de la plante <i>Euphorbia guyoniana</i>	66
Figure 23 : chromatogramme d'HPLC et temps de rétention de la phase aqueuse d' <i>Euphorbia guyoniana</i>	70
Figure 24 : GC-MS des huiles essentielles de la plante <i>Euphorbia guyoniana</i>	71
Figure 25 : sensibilité des souches bactériennes à l'extrait aqueux d' <i>Euphorbia guyoniana</i> ..	88
Figure 26 : sensibilité des souches bactériennes aux huiles essentielles d' <i>Euphorbia guyoniana</i>	88

Liste des tableaux

Tableau 1: condition de culture et d'incubation des bactéries isolées.....	59
Tableau 2: résultats des tests phytochimiques.....	62
Tableau 3: couleur, aspect et rendements massiques de l'extraction.....	64
Tableau 4 : résultats de l'analyse infrarouge des fractions flavonoïques d' <i>Euphorbia guyoniana</i>	67
Tableau 5: HPLC de la phase aqueuse d' <i>Euphorbia guyoniana</i>	70
Tableau 6 : Propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle d' <i>Euphorbia guyoniana</i>	72
Tableau 7: pré identification des souches isolées	74
Tableau 8: donnée des Galeries biochimiques.....	75
Tableau 9: identification par VITEK d' <i>Enterococcus faecalis</i>	76
Tableau 10: identification par VITEK de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	76
Tableau 11: identification par VITEK de <i>Citrobacter koseri</i>	77
Tableau 12: identification par VITEK de <i>Streptococcus agalactiae</i>	77
Tableau 13: identification par VITEK de <i>Staphylococcus aureus</i>	78
Tableau 14 : identification par VITEK de <i>Serratia marcescens</i>	78
Tableau 15: identification par VITEK de <i>Morganella morganii</i>	79
Tableau 16: identification par VITEK d' <i>Enterobacter cloacae</i>	79
Tableau 17: identification par VITEK de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	80
Tableau 18: identification par VITEK de <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	80
Tableau 19: identification par VITEK de <i>Proteus mirabilis</i>	81
Tableau 20: identification par VITEK de <i>Salmonella spp</i>	81
Tableau 21: identification par VITEK d' <i>Acinetobacter baumannii</i>	82
Tableau 22 : identification par VITEK d' <i>Enterobacter aerogenes</i>	82
Tableau 23 : identification par VITEK de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	83
Tableau 24 : identification par VITEK d' <i>Escherichia coli</i>	83
Tableau 25: diamètres d'inhibition des extraits d' <i>Euphorbia guyoniana</i>	85
Tableau 26: valeurs des CMI de l'extrait aqueux d' <i>Euphorbia guyoniana</i>	90

Table des matières

Introduction	1
--------------------	---

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I-1- Description, composition et activités biologiques des <i>Euphorbiaceae</i>	4
I-1-1- Généralités sur les <i>Euphorbiaceae</i>	4
I-1-2- Description botanique d' <i>Euphorbia guyoniana</i>	4
I-1-3- Taxonomie et systématique d' <i>Euphorbia guyoniana</i>	6
I-1-4- Répartition géographique d' <i>E. guyoniana</i>	7
I-1-5- Usage des Euphorbiacées	7
I-1-6- Activités biologiques d' <i>E. guyoniana</i>	8
I-1-6-1- Effet antibactérien	8
I-1-6-2- Effet insecticide	8
I-1-7- Toxicité d' <i>Euphorbia guyoniana</i>	8
I-1-8- Composition phytochimique	9
I-2- Les Molécules bioactives	10
I-2-1- Composés flavonoïques	10
I-2-1-1- Répartition, localisation et biodisponibilité des flavonoïdes	10
I-2-1-2- Biosynthèse des flavonoïdes	11
I-2-1-3- Structure chimique et classification des flavonoïdes	12
I-2-1-3-1- Flavones et flavonols	13
I-2-1-3-2- Flavanones et dihydroflavonols	14
I-2-1-3-3- Anthocyanes	14
I-2-1-4- Propriétés pharmacologiques des flavonoïdes	15
I-2-1-4-1- Propriétés antioxydantes	15
I-2-1-4-2- Propriétés antibactériennes	16
I-2-1-4-3- Autres effets biologiques	16
I-2-2- Les huiles essentielles	17
I-2-2-1- Répartition et localisation	17
I-2-2-2- Composition chimique des huiles essentielles	18
a- Groupe des terpènes	18
b- Groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane	19

Table des matières

I-2-2-3- Activités biologiques des huiles essentielles.....	19
I-2-2-3-1- Activité antibactérienne.....	20
I-2-2-3-2- Activité antioxydante.....	21
I-2-2-3-3- Autres activités biologiques.....	21
I-3- Les bactéries pathogènes du sol.....	21
I-3-1- Le sol.....	21
I-3-2- Principales bactéries pathogènes du sol.....	21
I-3-2- 1- <i>Salmonella spp</i>	22
I-3-2-2- <i>Listeria monocytogenes</i>	24
I-3-2-3- <i>Escherichia coli</i>	26
I-3-2-4- <i>Enterococcus faecalis</i>	27
I-3-2-5- <i>Bacillus cereus</i>	29
I-3-2-6- <i>Clostridium botulinum</i>	30
I-3-2-7- <i>Pseudomonas aerogenosa</i>	31
I-3-2-8- <i>Erwinia carotovora</i>	33
I-3-2-9- <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	34
I-3-3- Persistance des bactéries pathogènes dans le sol	35
I-3-4- Influence des paramètres physico-chimiques du sol.....	35
I-3-4-1- La texture du sol.....	35
I-3-4-2- Le pH.	36
I-3-4-3- Nutriments et matière organique	36
I-3-4-4- Les pratiques agricoles.....	36
I-3-5- Influence des paramètres biotiques du sol.....	37
I-3-5-1- Les microorganismes totaux.....	37
I-3-5-2- Les communautés bactériennes.....	37
I-3-5-3- Les protozoaires.....	38
I-3-6- Influence des paramètres environnementaux.....	38
I-3-6-1- La température.....	38
I-3-6-2- L'humidité.....	39
I-3-7- Transfert des bactéries pathogènes telluriques	39
I-3-7-1- Transfert aux graines des végétaux.....	40
I-3-7-2- Transfert par les eaux de pluie.....	40
I-3-7-3- Internalisation des pathogènes par les végétaux.....	40

Table des matières

III-4-4- Transfert par transport vertical dans le sol.....	41
III-4-5- Transfert par ruissellement et transport horizontal dans le sol.....	41
III-4-6-Transfert des bactéries pathogènes du sol vers les ressources en eau.....	42

Chapitre II : Matériel et méthodes

II-1- Matériel végétal.....	43
II- 2- Tests phytochimiques (Screening phytochimique).....	44
II-2-1- Préparation de l'infusé à 5%.....	45
II-2-2- Identification des anthocyanes	45
II-2-3- Identification des leuco-anthocyanes.....	45
II-2-4- Identification des tanins.....	45
II-2-5- Identification des tanins catéchiques	45
II-2-6- Identification des tanins galliques.....	45
II-2-7- Identification des quinones libres.....	45
II-2-8- Identification des saponosides.....	46
II-2-9- Identification des alcaloïdes.....	46
II-2-10- Identification des coumarines.....	46
II-2-11- Identification de l'amidon.....	46
II-2-12- Identification des flavonoïdes.....	46
II-2-13- Identification des mucilages.....	46
II-2-14- Identification des irridoides.....	47
II-2-15- Recherche des Protéines.....	47
II-2-16- Recherche des Lipoides.....	47
II-2-17- Recherche des Sucres réducteurs.....	47
II-2-18- Recherche des Glucosides.....	47
II-2-19- Recherche des Caroténoïdes.....	47
II-2-20- Recherche des Polyphénols.....	47
II- 3- Procédure d'extraction des flavonoïdes.....	48
II-3-1-Détermination de la teneur totale en flavonoïdes par spectrophotomètre.....	50
II-3-2- Identification des groupements fonctionnels des extraits flavonoïques par Infrarouge.....	50
II-3-3- Evaluation qualitative des flavonoïdes par Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC).....	51

Table des matières

II- 4- Procédure d'extraction des huiles essentielles.....	51
II-4-1- Rendement de l'extraction.....	52
II- 4-2- Caractérisation des huiles essentielles par GC-SM.....	52
II- 4-3- Analyse des paramètres organoleptiques et physico-chimiques de l'huile essentielle.....	53
II-4-3-1- Détermination des paramètres organoleptique.....	53
II-4-3-2- Caractéristiques physiques.....	53
II-4-3-3- Caractéristiques chimiques.....	54
II- 5- Isolement des souches bactériennes d'origine tellurique.....	55
II- 5-1- Technique d'échantillonnage du sol.....	55
II- 5-2- Préparation des dilutions.....	56
II- 5-3- Identification des souches isolées.....	56
II- 5-3-1- Examen macroscopique.....	56
II- 5-3-2- Examen microscopique (coloration de Gram, forme des germes).....	56
II- 5-3-3- Recherche des caractères biochimiques.....	56
a- Recherche de la catalase.....	56
b- Recherche de l'oxydase.....	57
c- Galerie biochimique classique.....	57
➤ Urée-Indole.....	57
➤ VP/RM (Voges-Proskauer).....	57
➤ TSI (Triple Sugar Iron).....	57
➤ Citrate de Simmons.....	58
➤ Esculine.....	58
➤ Recherche de la coagulase.....	58
II- 5-3-4- Identification par VITEK.....	58
a- Préparation de la cassette.....	58
b- Les méthodes de travail.....	59
II- 6- Evaluation de l'activité antibactérienne.....	59
II- 6-1- Revivification et repiquage des souches bactériennes	59
II- 6-2- Préparation de l'inoculum	60
II- 6-3- Préparation des disques.....	60
II- 6-4- Ensemencement.....	60
II- 6-5- Expression des résultats.....	60
II-6-6-Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) pour l'extrait flavonoïque	61

Table des matières

II-7- Analyse statistique.....	61
--------------------------------	----

Chapitre III : Résultats et discussion

III-1- Screening phytochimique.....	62
III-2- Rendement et caractérisation des flavonoïdes.....	64
III-2-1- Rendement en flavonoïdes.....	64
III- 2-2- Dosage colorimétrique des flavonoïdes	65
III- 2-3- Analyse des flavonoïdes par infrarouge.....	67
III-2-4-Analyse chromatographique de la phase aqueuse par HPLC.....	68
III- 3- Rendement et caractérisation des huiles essentielles.....	70
III-3-1- Caractérisation des huiles essentielles par GC-MS	71
III-3-2- Analyse des paramètres physico-chimiques de l'huile essentielle.....	72
III-4- Identification des souches bactérienne isolées.....	73
III- 4-1- Pré-identification des souches.....	73
III-4-2- Identification par VITEK	75
III-5- Evaluation de l'activité antibactérienne.....	85
III-5-1- Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI).....	89
Conclusion.....	93
Références bibliographiques.....	95
Annexes	

Le rapport entre l'Homme, l'animal et le végétal avec les bactéries est très vaste, allant d'une association biologique durable et réciproquement profitable (symbiose) jusqu'au déclenchement et développement d'une maladie donnée (pathogénicité), qui peut dans certains cas aboutir à la mort. Pour lutter contre ces bactéries, les pionniers de la microbiologie ont inventés une classe de médicament : les antibiotiques utilisés pour le traitement contre des maladies infectieuses. Leur mauvaise utilisation engendre des effets indésirables sur l'individu et la communauté (**Walsh, 2003**). La contamination de l'Homme par ces bactéries pathogènes peut avoir plusieurs origines dont une très importante qu'est le sol. Dans les communautés microbiennes du sol, certaines bactéries peuvent être pathogènes pour les plantes, les animaux et les humains (**Raaijmakers, 2009**). Le sol est un habitat naturel pouvant contenir des bactéries pathogènes primaires et opportunistes, notamment *Burkholderia spp.*, *Ochrobactrum spp.* et *Stenotrophomonas spp.* (**Berg et al., 2005**). Certaines bactéries pathogènes primaires pouvant provoquer de graves maladies chez l'Homme (intoxication alimentaire et pneumonie) sont des habitants naturels du sol, tels que *Bacillus cereus* et *Bacillus anthracis* (**Ticknor et al., 2001; Reis et al., 2014**). D'autres sont hautement pathogènes pour l'homme, telles que *Clostridium botulinum* et *Clostridium tetani* (**Smith, 1978; Smith, 1979**). Il existe certaines catégories de bactéries à vie saprophyte dans le sol, telles que *Listeria monocytogenes* (**Freitag et al., 2009**). *Pseudomonas aeruginosa* est également une bactérie très présente dans le sol (**Colinon et al., 2013**). Afin de pallier à ce fléau, la lutte contre ces pathogènes a toujours été difficile, et l'utilisation de produits biocides de désinfection des sols tels que la chloropicrine et le bromure de méthyle s'est révélée très dangereuse. Heureusement, ces produits ont été définitivement interdits, ce qui ne résout pas le problème de la lutte contre les infections bactérienne d'origine tellurique. Par ailleurs, la lutte antivectorielle au cours des épidémies, réalisée par des insecticides chimiques, continue d'entraîner un niveau élevé de contamination et de déséquilibre écologique, essentiellement dû à l'apparition du phénomène de résistance. C'est pourquoi l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a insisté sur la recherche de nouvelles méthodes de contrôle essentiellement biologiques. Toutes ces raisons et bien d'autres, ont poussé les chercheurs à se pencher plutôt vers la recherche de nouvelles molécules du règne végétal.

L'Homme utilise les plantes dans maints domaines de sa vie quotidienne, spécialement pour lutter contre diverses maladies. Une large partie de la population mondiale utilise les

plantes médicinales pour se traiter, plus particulièrement dans les pays en voie de développement, à cause de leur incapacité de bénéficier des vertus de la médecine moderne (Walsh, 2003).

L'Algérie est un pays connu pour sa biodiversité, et dispose d'une flore particulièrement riche et variée. On compte environ 3000 espèces dont 15 % sont endémiques et appartenant à plusieurs familles botaniques (Quenzel et Santa, 1963). Bien que le Sahara algérien soit connu pour son hostilité, et son grand potentiel floristique constitué de plantes médicinales, toxiques, et condimentaires, cette richesse connaît une dégradation intense depuis quelques décennies. Les espèces évoluant dans ce milieu tels que les *Euphorbiaceae* renferment diverses familles de composés chimiques tels que les alcaloïdes, les saponines (Tripathi et al., 1980), les terpènes (Mazoir et al., 2008), les flavonoïdes et les composés cyanogéniques (Hunsa et al., 1995). Parmi les espèces endémiques de l'Algérie, la plante médicinale *Euphorbia guyoniana* possède une importance particulière en pharmacopée. En effet selon Bellakhdar (1997), cette plante est utilisée par la population saharienne contre les piqures et morsures vénéneux et diverses infections. Le latex de cette plante est également utilisé pour enlever les verrues et extirper les épines.

Quelques travaux ont été réalisés sur l'espèce *Euphorbia guyoniana*, parmi lesquelles, nous pouvons citer celui de Haba (2007) qui a réalisé une étude phytochimique de deux *Euphorbiaceae* sahariennes : *Euphorbia guyoniana* Boiss. et Reut. et *Euphorbia retusa* Forsk. Celui de Boudiar et al. (2010) qui a identifié un nouvel alcaloïde en plus de six flavonoïdes déjà connus à partir des parties aériennes d'*Euphorbia guyoniana*. Une autre étude réalisée par Smara et al. (2014) parle sur une étude ethnobotanique et chimique d'*Euphorbia guyoniana* Boiss. et Reut. Concernant l'activité antibactérienne de l'espèce, Zellagui et al., 2012 ont étudié celle de deux extraits d'*Euphorbia guyoniana*. Herouini et al. (2015) ont également évalué l'activité antibactérienne des extraits aqueux d'*Euphorbia guyoniana* (*Euphorbiaceae*) récoltée dans Oued Sebseb (Sahara Algérien). Palici et al. (2015) a aussi valorisé l'activité antibactérienne des extraits flavonoïques d'*Euphorbia guyoniana*. Une autre étude menée par Benmeddour (2016) a démontré l'activité biologique de quelques espèces végétales dans la région de Aurès et au nord du Sahara Algérien, parmi ces espèces *Euphorbia guyoniana*.

Ainsi, cette thèse s'inscrit dans le cadre d'un projet de recherches entrepris pour valoriser les vertus de la flore algérienne en lutte biologique, et ayant comme objectif une première

contribution à l'analyse de l'effet de l'extrait aqueux et des huiles essentielles de la plante médicinale *Euphorbia guyoniana*, sur des bactéries pathogènes d'origine tellurique.

La stratégie adoptée pour réaliser cette étude porte sur trois axes principaux : établissement d'un inventaire des bactéries telluriques, isolées de divers types de sol, une caractérisation phytochimiques de l'extrait aqueux et des huiles essentielles (HEs), et enfin, une évaluation de leur effet antibactérien. L'ensemble des données relatives à ce projet de thèse de doctorat sont réparties comme suit :

- ❖ Une première partie théorique, où une synthèse bibliographique sera abordée, citant des généralités sur la plante utilisée, les principales molécules bioactives (Flavonoïdes et huiles essentielles) suivie de quelques détails sur les bactéries pathogènes d'origine tellurique.
- ❖ Une seconde partie pratique comportant les méthodes adoptées pour réaliser les objectifs visés : la récolte de la plante *Euphorbia guyoniana* et son identification, l'extraction et la caractérisation des flavonoïdes et des huiles essentielles, l'identification des souches bactériennes prélevées de différents sols, et le protocole appliqué pour étudier la sensibilité des souches bactériennes identifiées aux extraits testés.
- ❖ Une troisième partie comportant les résultats et leur discussion.
- ❖ Enfin une conclusion exposant les principaux résultats obtenus et les perspectives issues de ce travail.

CHAPITRE I

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I-1- Description, composition et activités biologiques des *Euphorbiaceae***I-1-1- Généralités sur les *Euphorbiaceae***

Les *Euphorbiaceae* sont une famille très hétérogène comptant environ 10000 espèces regroupées dans 336 genres. Elles sont considérées comme l'une des familles les plus vastes et les plus cosmopolites que compte l'embranchement des Angiospermes, et l'une des plus grandes familles des phanérogames en nombre d'espèces végétales, après les *Asteraceae*, les *Fabaceae* et les *Orchidaceae*. Seules les genres *Euphorbia*, *Croton* et *Phyllanthus* comptent près de la moitié des espèces de cette famille (Ozenda, 1991; Bruneton, 1996). Les *Euphorbiaceae* peuvent pousser partout, à l'exception des régions antarctiques et aux sommets des hautes montagnes (Bruneton, 1996). Les espèces de cette famille ont un aspect très variable et se caractérisent principalement par leur latex blanc collant et épais, irritant pour les yeux et provoquant des rougeurs sur la peau. Ce sont des plantes herbacées annuelles ou vivaces, lianes, arbustes ou arbres. Certaines espèces sont succulentes et/ou en forme de cactus. Les espèces qui constituent cette famille varient à la fois par leur appareil végétatif ainsi que par la structure de leur appareil reproducteur (fleurs) (Ozenda, 1991; Bruneton, 1996). Généralement les fruits se présentent sous forme d'une capsule à 3 loges, parfois à 2 ou plus rarement de 4 à 30 loges contenant chacune une seule graine. Le fruit est une capsule tricoque à déhiscence loculicide, septicide ou encore un schizocarpe à déhiscence explosive. La graine est albuminée et caronculée (Ozenda, 1991; Spichigera *et al.*, 2000).

Le genre *Euphorbia*, est le genre le plus représentatif de la famille des *Euphorbiaceae*. Il renferme près de 1600 à 2100 espèces soit 16% à 21% des espèces de cette famille (Ozenda, 1991; Spichigera *et al.*, 2000). Les espèces de ce genre, sont bien représentées au Sahara septentrional et en Europe.

I-1-2- Description botanique d'*Euphorbia guyoniana*

Euphorbia guyoniana est une plante vivace de la famille des *Euphorbiaceae*, endémique à l'Algérie, hémicryptophyte et d'un vert foncé. Elle peut être observée en pieds, isolés et en petits groupes. Elle est laticifère et relativement touffue, possédant un système racinaire très développé, pénétrant profondément dans le sol. Elle développe des tiges dressées et très ramifiées allant de 30 à 100 cm de haut. Les tiges portent des feuilles étroites, très peu nombreuses, parfois absentes surtout sur les rameaux fleuris. La floraison s'effectue en hiver (janvier-février) et parfois au printemps. Les fleurs, appelées cyathes sont de couleur jaunâtre et de taille réduite. Les graines sont sans caroncule, noirâtres et munies de côtes

longitudinales grises, sans pointe. Les tiges et les feuilles laissent couler un latex très âcre lorsqu'elles se cassent (Gubb, 1913; Ozenda, 1991) (Figure 1).



Photos (a) : partie aérienne d'*Euphorbia guyoniana*



Photos (b) : tige, fruit et graine d'*Euphorbia guyoniana*



Photos (c) : fleur d'*Euphorbia guyoniana*

Figure 1 : photos (a, b, c) d'*Euphorbia guyoniana* Boiss. & Reut. (Smara, 2014)

I-1-3-Taxonomie et systématique d'*Euphorbia guyoniana*

D'après la classification botanique classique, l'espèce *Euphorbia guyoniana* est une dicotylédone, dont la position taxonomique est la suivante (**Quenzel et Santa, 1963 ; Ozenda, 1991 ; Bruneton, 1996 ; Spichigera, 2000**):

- Règne : *Plantae*
- Embranchement : Spermaphytes
- Sous Embranchement : Angiospermes
- Classe : Dicotylédones
- Sous classe : *Rosidea*
- Ordre : Euphorbiales
- Famille : *Euphorbiaceae*
- Genre : *Euphorbia*
- Espèce : *E. guyoniana* (Boiss. et Reut.)

Selon la dernière classification, l'espèce est appelée *Euphorbia guyoniana tithymalus* (*Euphorbia guyoniana* Boissier et Reuter) Klotzsch & Garcke (**Smara, 2014**).

La majorité des *Euphorbes* sont connues par leur noms vernaculaires « Bouhliba » qui signifie plante à sève laiteuse, car les Euphorbes contiennent un suc laiteux (liquide blanc) collant et irritant appelée latex. L'espèce *E. guyoniana* est aussi connue sous ses noms vernaculaires : Lebbina (Ghardaia), Oum El L'bina (Adrar), Moulbina et Ammaia (Béni Abbés et El Goléa) (**Quenzel et Santa, 1963 ; Ozenda, 1983 ; Adjanohoun et al., 1989 ; Maiza et al., 1992 ; Chehma, 2006**).

I-1-4-Répartition géographique d'*E guyoniana*

Euphorbia guyoniana se répartie dans les régions ensablées et même dans le sable où elle a été répertoriée à l'étage tropical (**Maire, 1933; Ozenda, 1991**). Il s'agit d'une espèce commune à tout le Sahara septentrional et les régions pré-désertiques, au sud jusqu'à EL Golea et a Tadmait (**Ozenda, 1991**) (Figure 2).

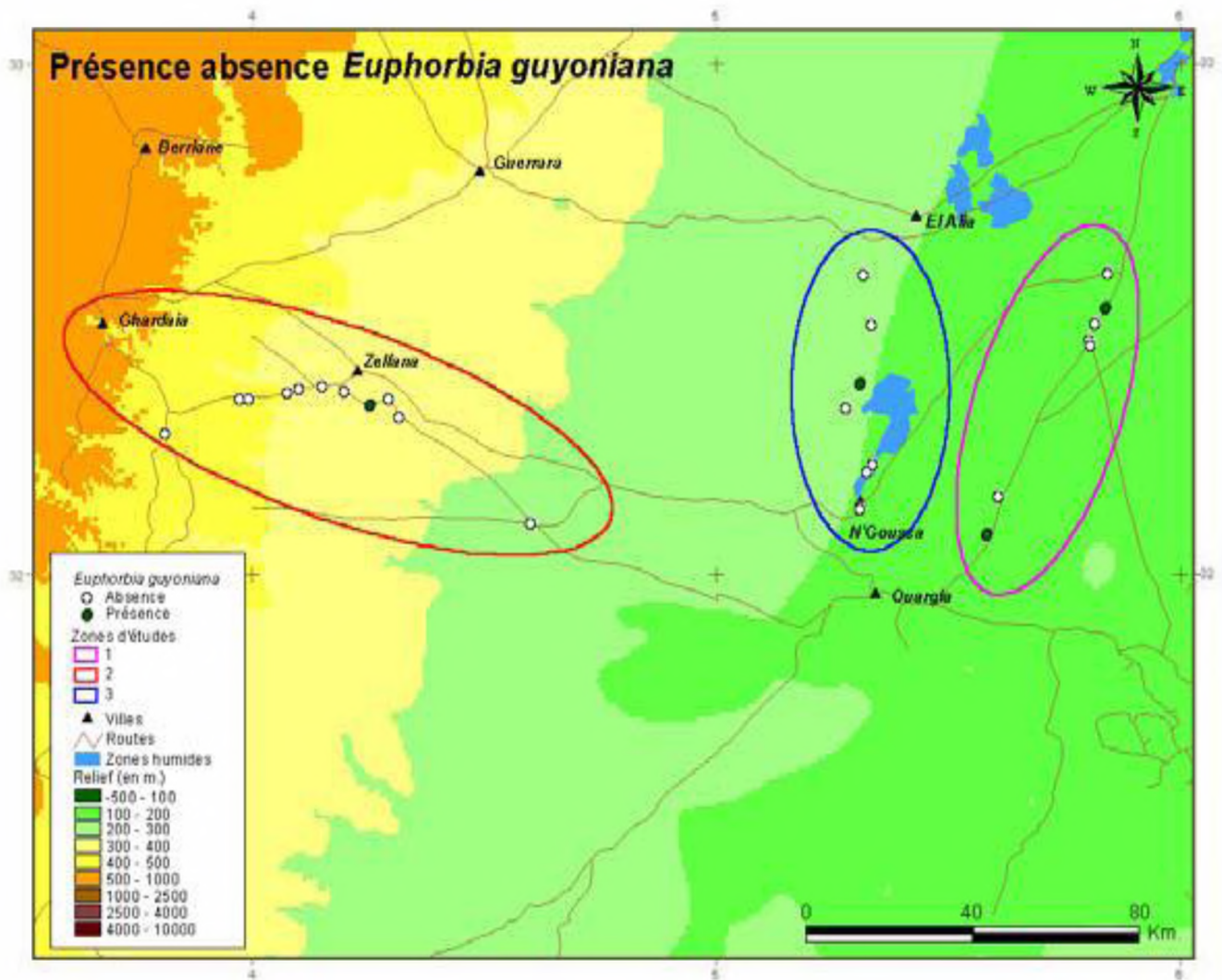


Figure 2: carte de répartition géographique d'*Euphorbia guyoniana* en Algérie (Haba., 2008).

I-1-5- Usage des Euphorbiacées

L'utilisation des Euphorbiacées est quasi-mondiale, principalement dans le traitement de plusieurs affections telles que les maladies gastro-intestinales et la migraine (Singla et Pathak, 1990). Certaines espèces de cette famille, possèdent également des propriétés cicatrisantes (Esmeraldino *et al.*, 2005), antibactériennes (Hernandez *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2008), antifongiques (Reza jassbi, 2006), anti-tumoral (Norhanom et Yadav, 1995), cytotoxique (Al-fatimi, 2005) et anti-inflammatoires (Mavar *et al.*, 2004; Lewu et Afolayan, 2009).

En Afrique, les espèces *Euphorbia thymifolia* Linn. et *Euphorbia hirta* Linn. ont des propriétés antihelminthiques puissantes (Kone et Kamanzi, 2006 ; Sandeep *et al.*, 2009).

L'espèce *Jatropha multifida* L. a montrée un effet hémostatique sur des rats ayant des troubles de coagulation (Klotoe *et al.*, 2017). L'espèce *Chutia abyssinica* Jaub. & Spach est utilisée pour traiter les maladies vénériennes et les maladies de la peau, le cancer et la fertilité chez les humains (Jeruto *et al.*, 2008). L'espèce *Phyllanthus reticulatus* Poir. est utilisée pour le traitement du rhumatisme, de la dysenterie et des maladies vénériennes (Nadkarni, 1982). L'espèce *Tragia cannabina* Linn. est connu pour être un très bon anti-inflammatoire (Hosahally *et al.*, 2012). Enfin, l'espèce *Euphorbia heterophylla* Linn. possède des propriétés antitussives (Holm *et al.*, 1997).

En Algérie, l'espèce *Euphorbia guyoniana* est utilisée en pharmacopée par de nombreuses populations sahariennes contre les morsures de serpents. Le latex de la plante est utilisé pour attaquer les verrues et pour extirper les épines. On l'applique également sur les morsures et piqûres venimeuses (Bellakhdar, 1997).

I-1-6-Activités biologiques d'*E. guyoniana*

I-1-6-1- Effet antibactérien

Les métabolites secondaires d'*E. guyoniana* sont dotés d'une activité antibactérienne importante vis-à-vis de certaines souches cliniques (Zellagui *et al.*, 2012). D'après ces auteurs, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ont montrés une sensibilité aux extraits Méthylène chloride-Méthanol, et n-butanol.

I-1-6-2- Effet insecticide

En quête de nouvelles techniques de lutte contre les insectes nuisibles, Kemassi *et al.* (2015) ont démontré que les extraits aqueux d'*Euphorbia guyoniana* exercent une abstinence et une diminution de la prise de nourriture, une diminution du poids corporel et des modifications dans l'anatomie du tube digestif des larves L5 et imagos de *Schistocerca gregaria*. Par ailleurs, et selon ces auteurs, l'extrait aqueux, acétonique et alcaloïdique provoquent des mortalités importantes chez les acridiens.

I-1-7- Toxicité d'*Euphorbia guyoniana*

Les composés lactoniques et quinoniques confèrent à la plupart des espèces appartenant à la famille des *Euphorbiaceae*, une toxicité vis-à-vis de l'homme. Elle se manifeste par une irritation des muqueuses, une induction de tumeurs et peut engendrer des allergies cutanées. La présence d'Euphorbone (C₁₅H₂₄O) et d'esters diterpéniques (les esters de phorbol), un

mélange complexe de dérivés acylés et acétylés en 12 et 13 (ou l'inverse) de phorbol, d'ingénol et de myrsinol, rend les *Euphorbiaceae* responsables de dermites bulbeuses sévères sur la peau, de lésions labiales et d'œdèmes pharyngés par ingestion. Les accidents oculaires peuvent être sévères (lésions de l'épithélium cornéen) (**Champy, 2008**).

Le latex d'*Euphorbia guyoniana* provoque des rougeurs sur la peau, des érythèmes ou des phlyctènes, ainsi que des irritations au niveau des yeux pouvant aller jusqu'à la cécité à des doses élevées (**Bellakhdar, 1997**). Selon cet auteur, les troubles de la vue sont accompagnés souvent de toux, de rhinite avec écoulement nasal, de laryngite et de brûlure des lèvres. Une fois absorbé, le latex entraîne des symptômes plus ou moins sévères de gastro-entérite et d'inflammation des muqueuses du tube digestif.

I-1-8- Composition phytochimique

Diverses familles de composés chimiques ont été isolées à partir des espèces appartenant à la famille des *Euphorbiaceae* dont les alcaloïdes (**De Nazaré et al., 2005**), les flavonoïdes et les composés cyanogénétiques (**Hunsa et al., 1995**), l'acide ellagique (**Mavar et al., 2004**), les saponines (**Tripathi et Tiwari, 1980**) et les terpènes (**Mazoir et al., 2008**). En revanche, très peu d'études ont été réalisées sur l'espèce *Euphorbia guyoniana*. **Ahmed et al. (2006)** ont isolé et caractérisé deux nouveaux diterpènes polyesters de type jatrophone (Guyonianin A, Guyonianin B) de la partie aérienne de la plante. Une autre étude menée par **Haba et al. (2007)** sur les racines d'*Euphorbia guyoniana* a permis d'isoler 20 composés terpéniques (5 diterpènes et 15 triterpènes). Ces composés se répartissent comme suit :

- Un diterpène polycyclique nouveau à squelette tiglane, dérivé du phorbol.
- Un diterpène macrocyclique à squelette jatrophone.
- Un triterpène de type cycloartane nouveau.
- Quatre triterpènes tétra cycliques à squelette cycloartane.
- Deux triterpènes tétra cycliques à squelette lanostane.
- Un triterpène tétra cyclique à squelette euphane.
- Un triterpène tétra cyclique à squelette tirucallane.
- Deux triterpènes penta cycliques à squelette multiflorane.
- Un triterpène penta cyclique à squelette taraxerane.
- Un triterpène acyclique.
- Deux stéroïdes.

L'étude de **Smara (2014)** sur les racines de la plante a abouti à l'isolement de flavonoïdes, et environ 20 composés terpéniques (5 diterpénoïdes et 15 triterpénoïdes). Ces composés sont

obtenus à l'état pur par l'utilisation souvent combinée de différentes méthodes chromatographiques.

Ces études montrent la richesse de la plante *Euphorbia guyoniana* en métabolites secondaires, qui se répartissent principalement en : terpènes et flavonoïdes. Ces derniers sont d'ailleurs utilisés comme marqueurs chimio taxonomiques (Haba, 2007).

I-2- Les Molécules bioactives

I-2-1-Composés flavonoïques

Les flavonoïdes englobent presque la totalité des composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ce sont des molécules aromatiques polysubstituées ayant un rôle de métabolites secondaires. Ces composés possèdent des structures chimiques variées et des caractéristiques propres (Bruneton, 1999; Havsteen, 2002). Ils sont considérés comme des pigments quasi-universels des végétaux, responsables des couleurs observés dans les pétales des fleurs. Ils participent à des fonctions vitales telles les processus photosynthétiques (Mukohata *et al.*, 1978), la régulation des gènes et la croissance (Havsteen, 2002).

I-2-1-1- Répartition, localisation et biodisponibilité des flavonoïdes

Les plantes ont de nombreuses interactions avec les conditions biotiques et abiotiques de leur environnement. Les flavonoïdes en sont impliqués, par leur accumulation dans les différentes cellules et tissus de la plante durant l'organogénèse et sous l'influence de plusieurs facteurs stimulants (Hutzler *et al.*, 1998). Sur le plan cellulaire, les flavonoïdes sont synthétisés dans les chloroplastes puis migrent et se dissolvent dans les vacuoles (Boudet, 2000). La répartition de ces composés montre des accumulations très localisées, généralement en relation avec une fonction physiologique ou avec l'interaction de la plante avec son environnement. Ainsi, les flavonoïdes qui ont une localisation épidermique ont un rôle d'écran vis-à-vis des rayonnements solaires. Ceux qui sont impliqués dans les mécanismes de défense ont plutôt une localisation sous épidermique (Boudet, 2000).

D'après Verhoeyen *et al.* (2002), Les flavonoïdes se trouvent dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racines, tiges, feuilles, fruits, graines, bois et pollens. Marfak (2003) signale que dans la majorité des cas, ils sont présents sous forme glycosylée ce qui les rends moins réactifs et plus hydrosolubles, permettant ainsi leur stockage dans les vacuoles des cellules épidermiques des fleurs, dans l'épiderme et le mésophylle des feuilles et dans les parenchymes des tiges et des racines. Par ailleurs, les types de flavonoïdes diffèrent selon les

espèces végétales. En effet, certaines végétaux ont l'exclusivité de posséder certaines classe de flavonoïdes, tels que les agrumes qui sont riches en flavanones, le soja en isoflavones, et les fruits et légumes en anthocyanes et en flavonols. Tandis que les chalcones se retrouvent plus fréquemment dans les pétales des fleurs (Lahouel, 2005; Piquemal, 2008). Les génines seules sont présentes dans les exsudats farineux de certaines plantes, dans les cuticules des feuilles, écorces et bourgeons ou sous forme de cristaux dans les cellules de certaines *Cactaceae* et plantes des régions arides (Lhuillier, 2007).

I-2-1-2- Biosynthèse des flavonoïdes

Toutes les étapes de la biosynthèse des flavonoïdes ne sont pas encore clairement élucidées, cependant elles restent les plus élaborées par rapport aux autres métabolites secondaires. Les flavonoïdes participent en tant que transporteurs d'électrons à la phase lumineuse de la photosynthèse des plantes. Ils sont donc synthétisés au niveau du chloroplaste (Elicoh-Middleton, 2000).

La synthèse des flavonoïdes est principalement initialisée par la formation du cycle A à partir de trois molécules de malonyl-coenzyme A (malonyl-CoA), issues du métabolisme du glucose. Les cycles B et C proviennent aussi du métabolisme du glucose, seulement par la voie du shikimate via la phénylalanine convertie en p -coumarate puis en p -coumaroyl-CoA. Le p -coumaroyl-CoA et les 3 malonyl-CoA ainsi formés se condensent en une seule étape enzymatique pour former une chalcone, la 4, 2', 4', 6'-tétrahydroxychalcone. La réaction est catalysée par la chalcone synthétase (Figure 3) (Bruneton, 1999; Marfak, 2003). Ce composé est métabolisé sous l'action de la chalcone isomérase qui provoque une fermeture stéréospécifique du cycle conduisant à une seule 2(S)-flavanone: la naringénine (Figure 4). Ce cycle s'hydrate ensuite pour former les différentes classes de flavonoïdes (Lhuillier, 2007). Enfin des réactions post-biosynthétiques sont effectuées afin de donner la structure finale des flavonoïdes tels que la glycosylation et l'acylation (Marfak, 2003). Cependant il existe aussi des flavonoïdes non glycosylés comme la quercétine (Bruneton, 1999; Elicoh-Middleton, 2000).

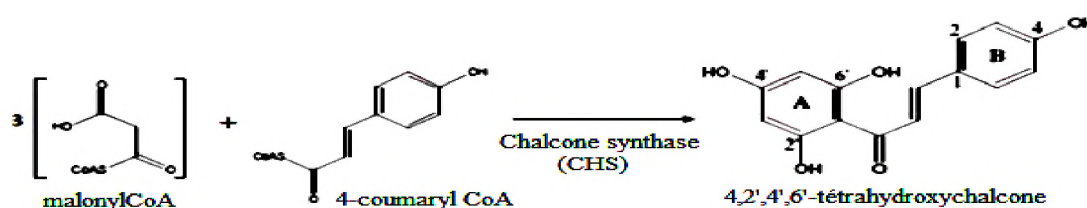


Figure 3 : étape initiale de la formation des flavonoïdes (Bruneton, 1999)

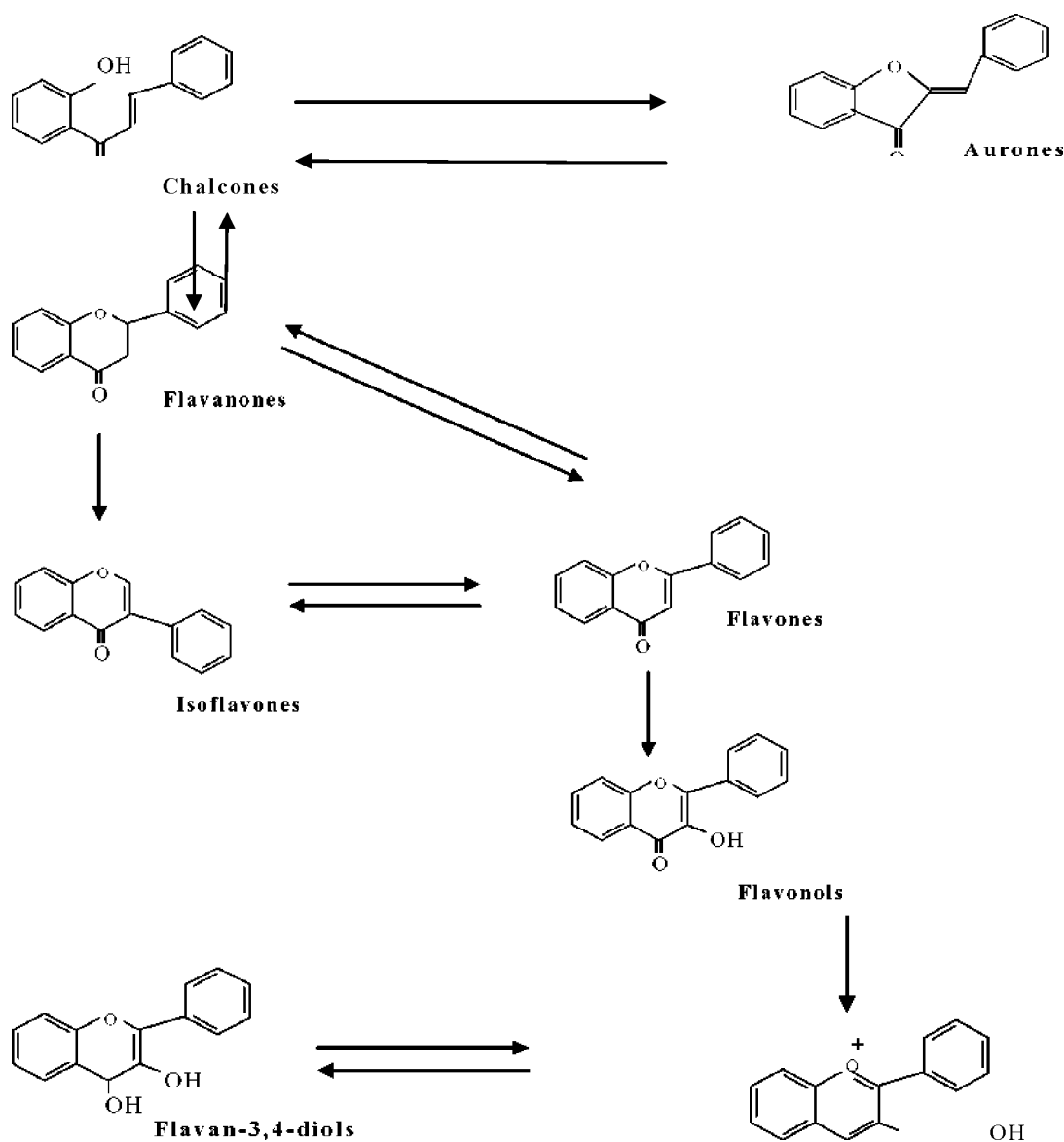


Figure 4 : schéma simplifié de la biosynthèse de différentes classes de flavonoïdes (Morreel *et al.*, 2006).

I-2-1-3- Structure chimique et classification des flavonoïdes

Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique identique et possèdent la même structure de base : un squelette carboné de quinze atomes de carbones constitué de deux cycles aromatiques (A) et (B) reliés entre eux par une chaîne en C₃ en formant ainsi l'hétérocycle (C) (Erdman *et al.*, 2007) (Figure 5). Généralement, la structure des flavonoïdes est représentée selon le système C₆-C₃-C₆ (Emerenciano *et al.*, 2007), et c'est le degré d'oxydation du noyau pyranique (la structure de Benzo- γ -pyrone) qui subdivisent les flavonoïdes en une douzaine de classes (Bruneton, 1999 ; Ameha, 2006).

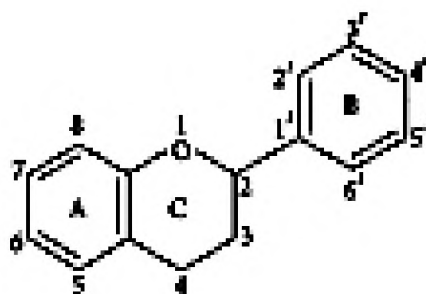


Figure 5: squelette de base des flavonoïdes (Di Carlo *et al.*, 1999)

Les différentes classes de flavonoïdes se distinguent par le degré d'hydroxylation et de méthylation, le degré de polymérisation, ainsi que par les substitutions et les conjugaisons sur le cycle C (Yao *et al.*, 2004 ; Tsimogiannins et Oreopoulou, 2006). Les classes les plus répandues et les mieux caractérisées sont : les flavones, les isoflavones, les flavanones, les flavanols et les anthocyanidines (Bruneton, 1999 ; Harborne et Williams, 2000 ; Heim *et al.*, 2002) (Figure 6).

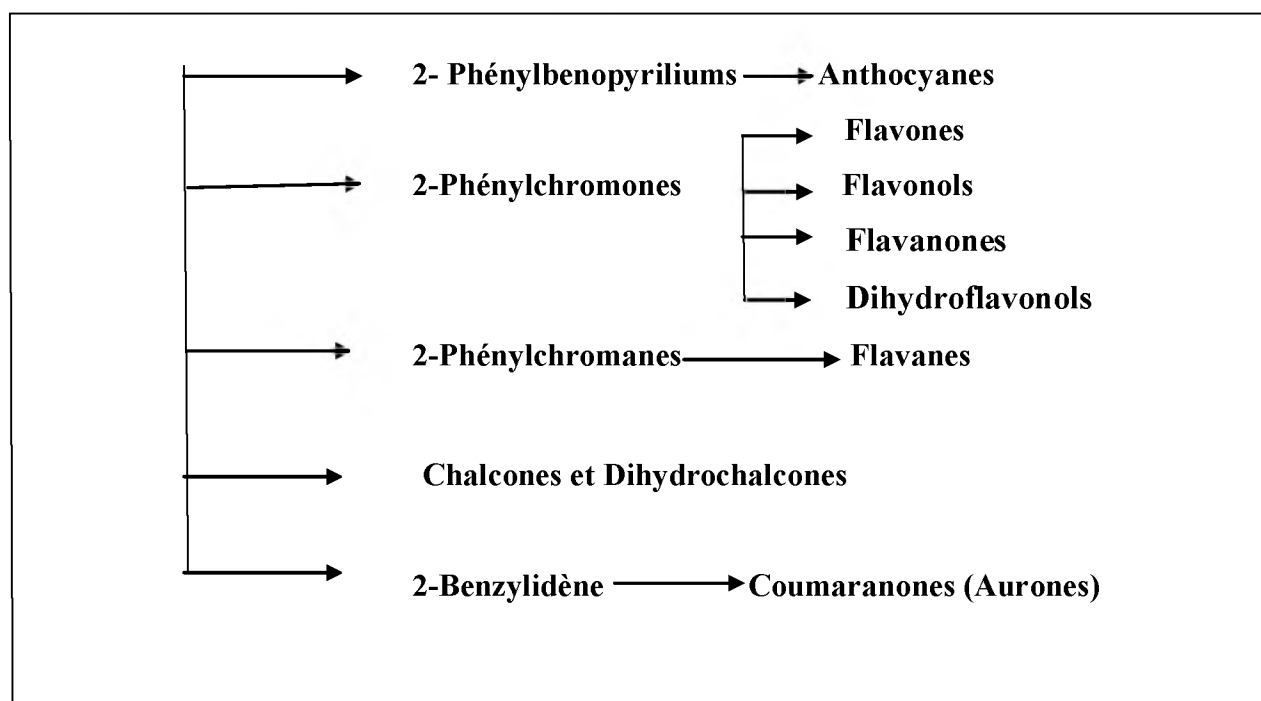


Figure 6 : schéma des différentes classes des flavonoïdes (Smara, 2014)

I-2-1-3-1- Flavones et flavonols

Tous les types de flavonoïdes dérivent de la 4, 2', 4', 6'- tétrahydroxychalcone et par conséquent, possèdent tous au moins trois hydroxyles phénoliques en C₅, C₇ et C_{4'}. Le cycle

A des flavones et des flavonols est substitué par deux hydroxyles polyphénoliques en position C₅ et C₇. Ces hydroxyles peuvent être libres ou étherifiés. Les flavonols se distinguent des flavones par la présence d'un groupement (OH) en position C₃ (**Bruneton, 2009**) (Figure 7).

I-2-1-3-2-Flavanones et dihydroflavonols

Les flavanones et les dihydroflavonols sont caractérisés par l'absence de la double liaison C₂-C₃ et par la présence de centres d'asymétrie. Les variations structurales sont de même nature que celles décrites pour les flavones et les flavonols. Les dihydroflavonols se distinguent des flavanones par l'hydroxylation de la position C₃ (**Bruneton, 2009 ; Harbone, 1986**) (Figure 7).

I-2-1-3-3- Anthocyanes

La diversité des anthocyanes s'explique par les nombreuses possibilités de substitution des cycles A, B et la nature du sucre en position 3 (C₃). Ils se trouvent dans la nature sous forme hétérosidique ou anthocyanine (**Smara et al., 2014**) (Figure 7).

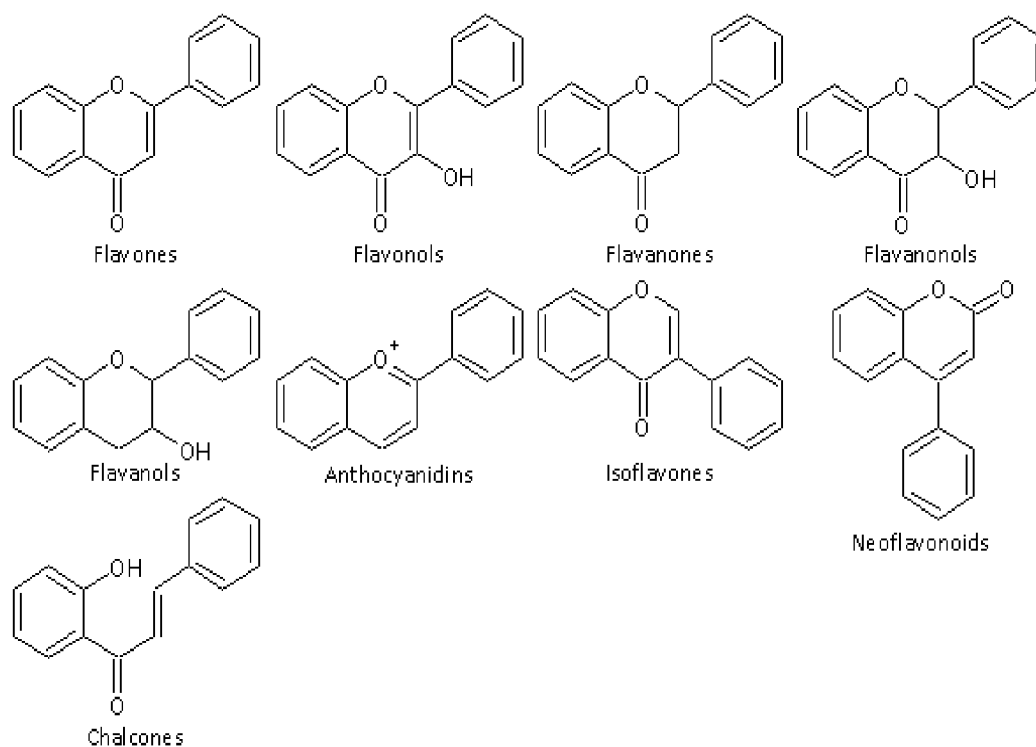


Figure 7 : structure des différents types de flavonoïdes (**Smara et al., 2014**)

Par ailleurs, chaque classe de flavonoïde peut être subdivisée en sous classe, selon le degré d'oxydation du noyau pyranique central (**Bruneton, 1999 ; D'archivio, 2007**) et aussi selon la position de la liaison entre le cycle B et C (**Birt et al., 2001 ; Graf et al., 2005**). Les composés de chaque sous-classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyles, méthoxyles et autres) sur les deux cycles aromatiques A et B (**Ribéreau-Gayon, 1968**).

I-2-1-4- Propriétés pharmacologiques des flavonoïdes

Depuis des temps très anciens, de nombreuses préparations médicinales utilisent les flavonoïdes comme composés de base. Leurs capacités à inhiber spécifiquement certaines enzymes, à stimuler certaines hormones ou neurotransmetteurs, et à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles (OH) et superoxyde (O₂⁻), les rendent très utilisés par la médecine moderne afin de traiter de nombreuses maladies (**Havsteen, 2002**).

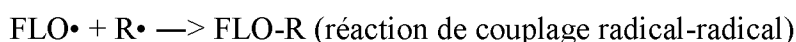
Ils sont également connus par leur capacité d'exercer des effets anti-infectieux, anti-inflammatoires, antiallergiques et antiulcéreux (**Di Carlo et al., 1999**). Des études épidémiologiques réalisées sur différentes lignées cellulaires ont démontré un potentiel anti-tumoral et anticancéreux des flavonoïdes (**Birt et al., 2001**).

I-2-1-4-1- Propriétés antioxydantes

Les flavonoïdes sont capables de piéger les radicaux libres en formant des radicaux flavoxyles moins réactifs, l'activité antioxydante des flavonoïdes est d'ailleurs la mieux décrite (**Laoufi, 2017**). Cette capacité peut être expliquée par leur propriété de donner un atome d'hydrogène à partir de leur groupement hydroxyle selon la réaction suivante :



Il en résulte de cette réaction de piégeage une molécule stable (RH) et un radical flavoxyle (FLO•). Ce dernier va subir un changement de structure par résonance pour donner des molécules de faible réactivité par rapport aux R•. En outre, les radicaux flavoxyles peuvent interagir entre eux pour former des composés non réactifs (**Amić et al., 2007**) :



La propriété antioxydante des flavonoïdes est donc étroitement liée à leur structure, et nécessite (Amić *et al.*, 2007) :

- Une structure ortho-dihydroxyphénolique du cycle B (3',4' dihydroxystructure), importante pour l'activité antiradicalaire des flavonoïdes, possédant un hétérocycle saturé ;
- Une double liaison C₂-C₃ conjuguée avec la fonction 4 oxo, responsable de la délocalisation des électrons, améliorant ainsi la capacité antiradicalaire ;
- Des groupements hydroxyles libres en C₃ et C₅.

La quercétine et la myricétine répondent à tous ces critères et ont ainsi une activité antioxydante efficace et importante (Middleton *et al.*, 2000).

I-2-1-4-2- Propriétés antibactériennes

Des études *in vitro* ont révélé que les flavonoïdes sont des substances antimicrobiennes efficaces contre un large éventail de micro-organismes (Johnson, 1999 ; Nicoli *et al.*, 1999).

En effet, le pouvoir bactéricide de différentes flavanones sur l'ADN gyrase de la bactérie *Staphylococcus aureus*, a été décrit par plusieurs études (Ohemeng *et al.*, 1993; Sato *et al.*, 1996). Plusieurs flavonoïdes, dont l'apigénine, la galangine, les flavones, les flavonols, les isoflavones, les chalcones et les flavanones, se sont révélés être des agents antibactériens puissants. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrases) ou à d'autres interactions pour inactiver les adhesines microbiennes, les protéines de transport et de l'enveloppe cellulaire (Cowan, 1999). Une autre étude réalisée par Afif Chaouche (2015) sur les activités antimicrobiennes des extraits flavonoïques des espèces : *Borago officinalis* et *Rubus fruticosus*, a montrée un effet marquant en inhibant la croissance de souches bactériennes isolées à partir de malades atteints d'infections respiratoires, à de très faibles concentrations.

I-2-1-4-3- Autres effets biologiques

Les flavonoïdes sont aussi connus pour être de puissants inhibiteurs de la prolifération des lymphocytes B et T (Namgoong *et al.*, 1994). Cet effet antiprolifératif pourrait s'expliquer par leur capacité à inhiber l'activité de certaines protéines kinases (protéine Kinase C ou protéine tyrosine kinase) (Namgoong *et al.*, 1994). Les flavonoïdes sont également connus pour le maintien d'une perméabilité vasculaire normale (Youdim, 2002). Ils sont également capables de protéger la muqueuse gastrique contre divers agents ulcérogènes (Martin *et al.*, 1994). Ces auteurs démontrent que la naringine et la quercétine exercent une activité

antiulcérogène mise en évidence chez le rat dont l'ulcère gastrique a été induit par l'éthanol. Ils peuvent également être des antispasmodiques, hypocholestérolémiants, diurétiques (**Bruneton, 1999**) et analgésiques (**Gonzalez-Trujano et al., 2007**).

Des recherches expérimentales suggèrent que les flavonoïdes font partie des substances susceptibles de retarder voire d'empêcher l'apparition de certains cancers, tout en réduisant d'une manière spécifique les risques d'en avoir chez les sujets humains (**Decloitre, 1993 ; Hertog, 1996 ; Depeint et al., 2002 ; Ren et al., 2003 ; Brusselmans et al., 2005**). Par ailleurs, et d'après **Tieppo et al. (2007)**, la quercétine et la rutine sont les deux flavonoïdes les plus connus pour prévenir l'apparition du cancer de l'appareil gastro-intestinal.

De nombreuses études semblent confirmer que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire (**Gonzalez-Gallego et al., 2007**).

Selon certaines études, les flavonoïdes ont des activités antivirales. En effet, ils peuvent agir contre le virus du HIV, grâce à leurs effets sur les enzymes responsables de la réplication du virus (HIV-1 reverse transcriptase ou HIV-1 integrase) (**Bylka et al., 2004 ; Tapas et al., 2008**). Les flavonoïdes ont aussi une influence sur la production des histamines, la raison pour laquelle on leur attribue selon **Marfak (2003)** des propriétés antiallergiques.

I-2-2- Les huiles essentielles

Les huiles essentielles, appelées aussi essences, sont des mélanges de substances aromatiques odorantes, produites par de nombreuses plantes. Par rapport à la masse végétale totale, elles sont présentes en très petite quantité. La dernière définition de ces composés a été donnée en Février 1998 par la norme AFNOR NF T 75-006 : «L'huile essentielles est un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques, soit par distillation sèche (**Bruneton, 1999**).

I-2-2-1- Répartition et localisation

Selon **Karray Bourraoui et al. (2009)**, les huiles essentielles sont présentes dans les fleurs, les tiges, les graines et les racines. **Bruneton (1999)**, indique que la localisation des structures histologiques spécialisées dans la synthèse et l'accumulation des huiles essentielles se trouve sur ou à proximité de la surface de la plante. Elles sont élaborées au sein du cytoplasme de certaines cellules, sous forme de petites gouttelettes qui confluent en place plus ou moins

étendues. Elles sont stockées dans les structures cellulaires spécialisées (cellule à huile essentielle, cellules à poils sécréteurs et canaux sécréteurs. (Figure 8). Tels que :

- Poils sécréteurs des Lamiacées (Thyme, Sauge) ;
- Cellules à huiles essentielles des Lauracées (Cassia, Laurier) ;
- Canaux sécréteurs des Apiacées (Anis, Coriandre) et des Astéracées (Armoise, Pissenlit);
- Poches sécrétrices des Rutacées (Orange, Bergamote).

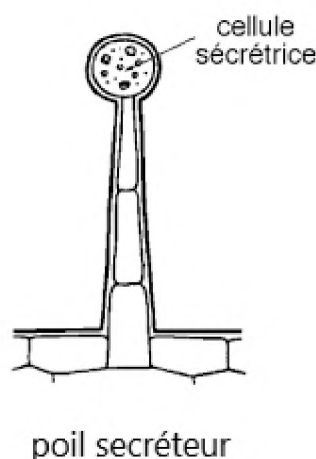


Figure 8 : cellule à huile essentielle (Badoc, 1988)

I-2-2-2- Composition chimique des huiles essentielles

Les composants qui constituent les huiles essentielles sont dits «aromatiques» en raison de leur caractère odoriférant, ce qui ne doit guère être confondu avec leur structure chimique. Les huiles essentielles sont constituées d'un mélange complexe et variable de composés qui appartiennent, d'une manière quasi exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes.

a- Groupe des terpènes

Ce groupe, principalement composé de monoterpènes et de sesquiterpènes, représente 90 à 95% des huiles totales. Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structure cyclique ou de chaîne ouverte. La présence d'unité isoprénique à cinq atomes de carbone (C_5H_8) dans leur squelette leur confère une particularité structurale. En fonction du nombre d'entités isoprènes, les terpènes sont subdivisés en monoterpènes formés de deux isoprènes

(C₁₀H₁₆), en sesquiterpènes formés de trois isoprènes (C₁₅H₂₄), en diterpènes formés de quatre isoprène (C₂₀H₃₂), en tétraterpènes formé de huit isoprènes conduisant aux caroténoïdes et enfin en polyterpènes formés de neuf à trente isoprènes (**Hernandez-Ochoa, 2005**). D'après cet auteur, ce sont les monoterpènes qui représentent la majorité des constituants des huiles essentielles (parfois plus de 90%). Ces molécules volatils peuvent être acycliques (mycènes, ocymène), monocycliques (terpinène, P-cimène) ou bicycliques (pinène, sabinène). A ces terpènes s'attache un certain nombre de substance à fonction chimique différente : alcools, aldéhydes, cétones, et esters.

b- Groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane

Ce groupe de métabolites est beaucoup moins fréquents, et constitue 5 à 10% des huiles totales. Cette classe comprend des composés odorants comme la vanilline, l'eugénol, l'anéthole, l'estragole et bien d'autres (**Bruneton, 1999**). Ces composés non volatils sont issus soit de la dégradation des terpènes non volatils provenant à titre d'exemple de l'auto-oxydation des carotènes, soit des acides gras comme les acides linoléiques (**Piochon, 2008**).

I-2-2-3- Activités biologiques des huiles essentielles

Depuis leur découverte, les huiles essentielles sont très utilisées dans les préparations pharmaceutiques, grâce aux diverses activités biologiques qu'elles possèdent (**Luque de Castro et al., 1999**).

L'activité biologique d'une huile essentielle est directement liée à sa composition chimique, aux groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) et à leurs effets synergiques (**Dorman et Deans, 2000 ; Ultee et al., 2002**). Les composés chimiques de plus grande efficacité sont les phénols (thymol, carvacrol et eugénol), les alcools (α-terpinéol, terpinène-4-ol et linalol), les aldéhydes, les cétones et plus rarement les terpènes (**Cosentino et al., 1999; Dorman et Deans, 2000**). Les alcools agissent généralement en dénaturant les protéines, comme solvants ou comme agents de déshydratation (**Dorman et Deans, 2000**). Les aldéhydes agissent par des réactions de transferts d'électrons réagissant avec des composés nitrés (protéines et acides nucléique) vitaux pour la bactérie (**Dorman et Deans, 2000**).

I-2-2-3-1- Activité antibactérienne

Les huiles essentielles ont, à des degrés divers, des propriétés antibactériennes très marquées. Ce pouvoir s'exerce sur un nombre assez élevé de bactéries pathogènes, y compris

des souches habituellement résistantes. Cette propriété est en rapport direct avec leur richesse en terpènes (**Bruneton, 1999**). L'activité antibactérienne des huiles dépend principalement de leur composition chimique, particulièrement leurs composés volatils majeurs (**Sipailiene et al., 2006**). Elles agissent en empêchant la multiplication des bactéries, leur sporulation et la synthèse de leurs toxines.

Les huiles essentielles sont très efficaces sur les germes résistants aux antibiotiques, ce qui leur confère une bonne place parmi les moyens thérapeutiques de guérison, d'atténuation ou de prévention des maladies et des infections (**Buchbauer et Jirovetz, 1994**). En effet, les huiles essentielles sont utilisées pour la désinfection de l'air, grâce au grand nombre de molécules volatiles qu'elles contiennent. Elles sont utilisées en diffusion dans l'atmosphère ou diluées dans les produits de nettoyage, afin d'éliminer 90 % du niveau bactérien, particulièrement dans le milieu hospitalier. Elles désinfectent, désodorisent et parfument agréablement et naturellement l'air (**De Bilierbeck, 2000 et 2002 ; Pibiri et al., 2001**).

Les huiles essentielles s'avèrent efficace pour le traitement des affections bactériennes et fongiques de la cavité buccale (**Shapiro et al., 1994**) et du système respiratoire (**Inouye et al., 2001**). Ces auteurs ont montré que les huiles essentielles du Thym, d'écorce de Cannelle, et de Menthe poivrée sont très efficace sur les principaux germes pathogènes responsables des infections respiratoires, notamment *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoneae*, *Streptococcus pyogenes* et *Staphylococcus aureus*. Dans une autre étude menée par **Arab et al. (2014)**, l'effet de l'huile essentielle de la Sarriette des montagnes sur les infections urinaires a été bien mis en évidence.

Les huiles essentielles agissent au niveau de la membrane. En effet, la plupart des études confirment que le principal site d'action des huiles essentielles est la membrane plasmique (**Shunying et al., 2005**), car le caractère hydrophobe de ces dernières leur permet de se lier avec les lipides constituant la membrane plasmique (**Burt, 2004**), tout en induisant une perméabilité aux ions potassium et proton, entraînant ainsi la mort de la bactérie (**Ultee et al., 1999 et 2000 ; Burt, 2004**).

I-2-2-3-2- Activité antioxydante

L'activité antioxydante des huiles essentielles a été démontrée dans diverses études. Elle est nettement plus élevée chez certaines espèces telle que *Thymus vulgaris* et *Eucalyptus globulus* (Aaza et al., 2011). Selon Afif Chaouche (2015), les huiles essentielles des trois plantes ; l'ortie, la ronce et la bourrache ont montré une légère activité antioxydante, avec celle de l'ortie qui se montre un peu plus forte. Cette activité, peut être mesurée par plusieurs méthodes dont le DPPH.

I-2-2-3-3- Autres activités biologiques

Certaines drogues à huiles essentielles telle que la Menthe et la Verveine sont réputées efficaces pour diminuer ou supprimer les spasmes gastro-intestestinaux. Elles stimulent les sécrétions gastriques d'où les qualificatifs de digestives et de stomachiques qui leur sont décernés (Bruneton, 1999).

Dans l'activité anticancéreuse, les huiles essentielles et leurs constituants volatils ont également montrées leur pouvoir (Edris, 2007). En effet, les huiles essentielles agissent non seulement au niveau de la prévention du cancer (Béliveau et Gingras, 2005). De plus, certaines études ont confirmées l'activité cytotoxique des huiles essentielles de *Myrica gale* L. et *Croton flavens* L. (Sylvestre et al., 2005) et d'*Artemisia annua* L. (Li et al., 2004).

I-3- Les bactéries pathogènes du sol**I-3-1- Le sol**

Le sol est un écosystème complexe, un filtre et un bioréacteur indispensable à la vie sur terre. Il est constitué de la couche externe de la croûte terrestre, sa structure est solide et il contient des minéraux et des organismes. Il permet un intense échange de matière et d'énergie entre l'air, l'eau et les roches. Le sol, contribue d'une manière importante aux cycles biogéochimiques des éléments majeurs et des éléments traces ce qui lui confère une position clé dans la biosphère continentale. Le sol possède des propriétés physiques de part sa texture et sa structure, des propriétés chimiques liées à la nature des matériaux qui le composent et des propriétés biologiques influencées par la présence d'un nombre élevé de micro-organismes, d'organismes végétaux (micro-algues, racines des plantes supérieures...) et animaux (micro et mésofaune du sol) (Locatelli, 2015).

I-3-2- Principales bactéries pathogènes du sol

La communauté microbienne du sol peut renfermer certains microorganismes pouvant se révéler pathogènes pour l'homme, les animaux et les plantes.

Certaines actions anthropiques (agriculture, industrie, urbanisation), peuvent modifier la composition bactérienne des sols. En agriculture, l'utilisation de fertilisants des sols par le biais du recyclage des produits résiduels organiques (fumiers, lisiers, boues de station d'épuration) peut faire pénétrer des bactéries potentiellement pathogènes pour l'homme telles que *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* et *L. monocytogenes* (Locatelli, 2015).

Parmi la grande diversité de bactéries pathogènes qui existent dans le sol, quelques exemples ont été choisis pour être décrits, dans la suite de cette partie bibliographique.

I-3-2- 1- *Salmonella spp.*

Au sein de l'union européenne, *Salmonella spp.* est classée comme le deuxième agent responsable d'infections d'origine alimentaire (EFSA, 2011), principalement en France (Jourdan-Da Silva et Le Hello, 2010). *Salmonella spp.* est l'agent qui provoque le plus fort taux d'hospitalisation et aboutit au plus fort taux de mortalité (Scallan *et al.*, 2011). En Algérie, elle est responsable de 70-75% environ des Toxi-infections Alimentaires Collectives déclarées.

Le genre *Salmonella* appartient à la grande famille des *Enterobacteriaceae*. Il est divisé en 2 espèces : *S. bongori* et *S. enterica* (Reeves *et al.*, 1989 ; Tindall *et al.*, 2005). *Salmonella enterica* est constituée de 6 sous-espèces : *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* et *indica* (Brenner *et al.*, 2000). Les espèces de ce genre sont toutes munies de 3 types d'antigènes à leurs surfaces: un antigène localisé dans la paroi (l'antigène somatique O), deux autres dans la capsule (l'antigène flagellaire H et l'antigène de virulence Vi) (Grimont *et al.*, 2000). C'est la diversité ainsi que la combinaison de ces 3 antigènes qui permet de différencier plus de 2500 sérotypes de *Salmonella* au sein des sous-espèces de *Salmonella enterica* et au sein de l'espèce *Salmonella bongori* (Grimont et Weill, 2007).

Les salmonelles sont des petits bacilles Gram négatif (2 à 5 µm de longueur sur 0,7 à 1,5 µm de largeur), non sporulés, sauf le sérovar *Gallinarum*, et mobiles grâce à une ciliature péritriche. Leur mode respiratoire est aéro-anaérobies, elles réduisent les nitrates en nitrites, peuvent utiliser le citrate comme seule source de carbone, fermentent le glucose mais pas le lactose et le sucrose et produisent du gaz à partir du glucose excepté *Salmonella Typhi*. Les salmonelles sont oxydase négatif.

L'identification du genre *Salmonella* au sein des Entérobactéries se fait par la détection de l'absence de certaines enzymes : uréase, tryptophanase, tryptophane désaminase et β -galactosidase (Grimont *et al.*, 2000 ; Korsak *et al.*, 2004) (Figure 9).



Figure 9 : photo d'une *salmonella spp* sous microscope photonique (Gr x100)(Gendrel, 1997)

Le principal habitat de *Salmonella spp.* est le tractus gastro-intestinal des mammifères et des oiseaux. Certaines souches peuvent également se trouver dans les animaux à sang froid et les animaux aquatiques (Scherer et Miller, 2001). Elles peuvent être isolées des hommes et des animaux infectés, mais aussi des individus sains. La principale source de propagation des Salmonelles dans l'environnement est le réservoir animal. Le sol des pâturages, le sol des cultures après épandage et l'eau peuvent être contaminés par la présence des salmonelles dans les matières fécales des animaux (Baudart *et al.*, 2000 ; Winfield et Groisman, 2003 ; Jacobsen et Bech, 2012). On peut trouver les Salmonelles à la fois dans les aliments d'origine animale (viande, lait, œuf) et dans les produits frais (fruits et légumes).

La pathogénicité des Salmonelles pour les hommes et les animaux est conditionnée par la spécificité d'adaptation vis à vis d'une espèce cible des différents sérovars. A titre d'exemple, les sérovars *S. Typhi* et *S. Paratyphi* qui sont spécifiquement pathogènes pour l'homme, peuvent déclencher de sévères fièvres entériques mais inoffensifs pour les animaux. D'autres sérovars tels *S. Abortus-ovis* (mouton) et *S. Gallinarum* (volaille) sont au contraire plus spécifiques d'une espèce animale. Il existe des sérovars ubiquitaires, tels que *S. Enteritidis* et *S. Typhimurium*, qui peuvent affecter à la fois l'homme et l'animal en provoquant des troubles gastro-intestinaux moins sévères que les fièvres entériques (Velge *et al.*, 2005).

La plupart des sérovars sont transmis par voie alimentaire (Velge *et al.*, 2005), et la majorité des épidémies des salmonelles sont dus à des sérovars non typhoïdiens (Velge *et al.*, 2005 ; EFSA, 2011).

I-3-2-2- *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes est une bactérie pathogène qui entraîne de forts taux de mortalité. Cependant l'incidence des listérioses reste plus faible que celle des salmonelloses (EFSA, 2011; Goulet *et al.*, 2012). Chez les hôtes sains, la listériose se manifeste par une gastroentérite, en revanche chez les sujets immunodéprimés des symptômes plus graves peuvent se manifester tels que la septicémie et la méningite (Sindic, 2002).

Huit espèces sont rassemblées dans le genre *Listeria* : *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. grayi*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. marthii* et *L. rocourtiae* (Rocourt, 1999; Graves *et al.*, 2010; Leclercq *et al.*, 2010). Après plusieurs classifications, le genre *Listeria* appartient désormais à la branche phylogénique des *Clostridia* tels que les genres *Lactobacillus*, *Streptococcus* et *Bronchothrix* (Rocourt, 1988; Rocourt, 1999).

Les bactéries du genre *Listeria* sont de petits bacilles (1 à 2 µm de long et 0,5 µm de diamètre), Gram positif, non sporulés et non capsulés. Elles sont mobiles à des températures comprises entre 20°C et 25°C grâce à un système flagellaire péritriche. Elles sont microaérophiles, oxydase négative et catalase positive. Elles peuvent se développer à des températures qui se situent entre -2°C et 45°C (psychrotrophes). Cependant, leur température optimale de croissance est comprise entre 30°C et 37°C (Rocourt, 1999; Bornert, 2000). Phénotypiquement, toutes les espèces de *Listeria* sont similaires avec quelques différences prêtes par rapport à la production d'acide à partir du D-xylose, L-rhamnose et alpha méthyl D mannoside (Gray, 1966; Allerberger, 2003) (Figure 10).



Figure 10 : photo d'une *Listeria monocytogenes* sous microscope photonique (Gr x 100)(EFSA, 2011)

Les souches de *Listeria* contiennent des déterminants antigéniques, au niveau de leur paroi (antigène O) et au niveau de leurs flagelles (antigène H). La différenciation de *L. monocytogenes* des autres espèces se fait grâce à la combinaison unique de ces antigènes (Liu, 2006).

L. monocytogenes peut se trouver dans le tractus intestinal des hommes et des animaux malades mais aussi des individus sains (Esteban *et al.*, 2009). Son existence dans le sol, les boues et les effluents de stations d'épuration est donc due à son excrétion dans la matière fécale (Müller, 1990; Garrec *et al.*, 2003; Nightingale *et al.*, 2004; Paillard *et al.*, 2005). C'est une bactérie ubiquitaire, largement répandue dans l'environnement principalement le sol et l'eau (Welshimer, 1960 et 1968; Welshimer et Donker-Voet, 1971; Weis et Seeliger, 1975; Welshimer, 1975; Colburn *et al.*, 1990; Lyautey *et al.*, 2007). A cause de sa large distribution dans l'environnement, *L. monocytogenes* favorise la contamination des denrées alimentaires à différents stades de la production. Cette bactérie se trouve fréquemment dans les produits carnés, les poissons, les légumes et les produits laitiers (Farber et Peterkin, 1991; Beuchat, 1996).

Sur les 8 espèces de *Listeria* qui existe, deux seulement sont pathogènes : *Listeria monocytogenes* (pathogène pour l'homme et l'animal) et *Listeria ivanovii* (pathogène pour l'animal) (Hof et Hefner, 1988; Low et Donachie, 1997; Vazquez-Boland *et al.*, 2001). Cette bactérie est considérée comme un pathogène opportuniste, car elle affecte essentiellement les personnes dont le système immunitaire est faible tels que les femmes enceintes, personnes hospitalisées, et les personnes âgées.

La capacité de *L. monocytogenes* de pénétrer et de se multiplier dans les cellules de l'épithélium intestinal pour gagner les vaisseaux lymphatiques et les vaisseaux sanguins lui confère sa pathogénicité (Vazquez-Boland *et al.*, 2001). Cette dernière est contrôlée par une série de facteurs de virulence (internalines, hémolysines, phospholipases...) (Farber et Peterkin, 1991; Vazquez-Boland *et al.*, 2001).

En Algérie, le premier cas clinique de listériose humaine a été décrit par Benallegue, *et al* en 1967 (Bellouni, 1990). Onze souches de *Listeria* (2 *L. monocytogenes*, 1 *L. welshimeri*, 2 *L. seeligeri*, 6 *L. innocua*) ont été isolées et identifiées à partir du placenta de bovins ainsi qu'une souche de *L. innocua* à partir de fromages (Bellouni, 1990).

I-3-2-3- *Escherichia coli*

Escherichia coli est une bactérie pathogène opportuniste. A la différence des pathogènes primaires, elle fait partie de la flore intestinale des individus et est inoffensive chez un sujet sain. Par contre, elle peut provoquer des infections dont les symptômes sont variés chez un sujet immunodéprimé (Sindic, 2002). Cette bactérie représente également un indicateur sanitaire recherché pour l'évaluation de la qualité de l'eau.

Les bactéries appartenant au genre *Escherichia* sont des bacilles Gram négatif, ayant une taille qui varie de 0,3 à 1 µm de diamètre et de 1 à 6 µm de long. Elles sont aéroanaérobies, oxydase négative, catalase et nitrate réductase positive, possédant à la fois un métabolisme respiratoire et fermentatif. Elles sont non sporulées, parfois capsulées et peuvent être mobiles grâce à une ciliature péritriche. La différenciation des espèces de ce genre peut se faire grâce à des caractéristiques biochimiques spécifiques, se basant sur la dégradation de multiples sources de carbone (Figure 11).

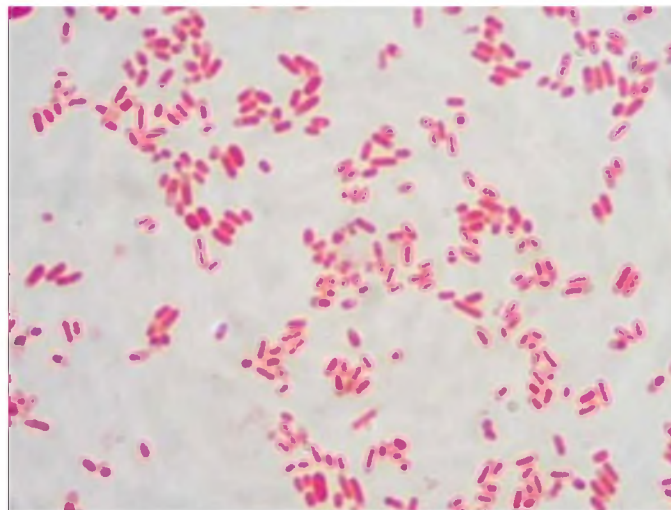


Figure 11 : photo d'*Escherichia coli* sous microscope photonique (Gr x 100) (EFSA, 2007)

E. coli représente la seule espèce dominante (80-90%) de la flore bactérienne aérobie de l'intestin de l'homme à raison de 10^7 à 10^9 UFC par gramme de fèces (Tenailon *et al.*, 2010). Cette bactérie est disséminée dans l'environnement via les déjections animales et toutes sortes de déchets humains. Elle est souvent trouvée dans les amendements organiques d'origine animale et les eaux usées (Shannon *et al.*, 2007; Klein *et al.*, 2010). Elle se trouve souvent dans les cours d'eau, les aquifères, les sédiments et le sol (Solo-Gabriele *et al.*, 2000; An *et al.*, 2002; Byappanahalli *et al.*, 2006). La présence de cette bactérie dans un milieu autre que le tractus intestinal la rend pathogène.

Les souches d'*E. coli* sont responsables d'infections intestinales et extra-intestinales (infections urinaires, bactériémies, méningites...). Elles sont capables de survivre et de se

multiplier dans le tractus digestif en contournant les défenses immunitaires de l'hôte. Les signes cliniques développés par *E.coli* diffèrent d'une souche à une autre. Ces souches sont ainsi classées, en médecine humaine, en pathovars ou pathotypes regroupant des sérotypes spécifiques. Chez l'homme, les souches impliquées dans des infections intestinales sont classées en six pathotypes : les EPEC pour «E. coli Enteropathogènes», les EHEC «E. coli Entérohémorragiques», les ETEC «E. coli Entérotoxinogènes», les EIEC «E. coli Entéroinvasifs», les EAEC «E. coli Entéroaggregatifs» et les DAEC «E. coli à adhésion diffuse». En plus de ces pathovars responsables d'infections intestinales, il existe d'autres pathovars responsables d'infections extra-intestinales, tels que les *E. coli* associés à des méningites (MNEC «Meningitis-associated E. coli») ou responsables d'infections urinaires (UPEC «Uropathogenic E. coli») (**Russo et Johnson, 2000**).

En Algérie, le taux de prévalence des infections due à *E. coli* est de 23,14 % (**Bekkal Brikci et Dib, 1999**).

I-3-2-4- *Enterococcus faecalis*

Comme *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* est une bactérie pathogène opportuniste, appelé auparavant *Streptococcus faecalis*, classé dans le genre *Streptococcus* (groupe D). Actuellement le genre *Enterococcus* englobe 28 espèces (**Devriese et al., 1993; Foulquié Moreno et al., 2006**).

Les bactéries du genre *Enterococcus* sont des coques Gram positif, non capsulés et non sporulés. Ces bactéries sont catalase et oxydase négatives. La plupart des espèces peuvent croître à des températures comprise entre 10°C et 45°C, cependant la température de croissance optimale est de 35 °C (**Boutibonnes et al., 1993**). Un milieu contenant 6,5% de NaCl, 40% de sels biliaires et 0,1% de bleu de méthylène à un pH de 9,6% est un milieu favorable à leur croissance. *E. faecalis* est une espèce particulièrement résistante aux fortes températures, à l'éthanol, à une osmolarité élevée, aux différents détergents, ainsi qu'aux métaux lourds (**Flahaut et al., 1996; Flahaut et al., 1998; Rincé et al., 2001; Benachour et al., 2005**) (Figure 12).

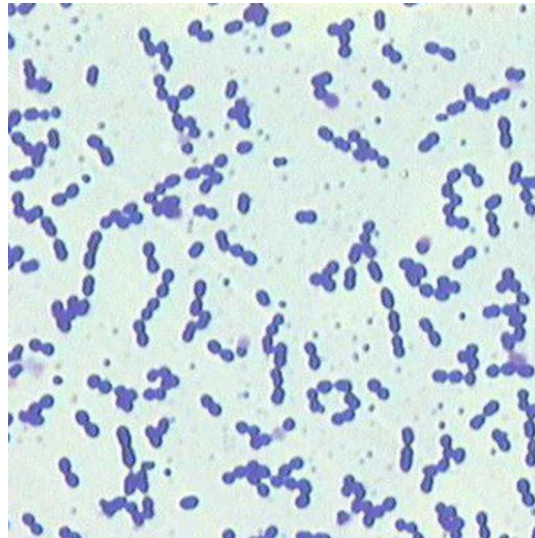


Figure 12 : photo d'une *Enterococcus faecalis* sous microscope photonique (Gr x 100)
(Pelletier, 1996)

E. faecalis est une bactérie commensale de l'intestin de l'homme et des animaux à sang chaud. Parmi toutes les espèces d'*Enterococcus*, *E. faecalis* reste la majoritaire dans les excréments humains avec des concentrations allant de 10^5 à 10^7 UFC par gramme de fèces (Noble, 1978; Leclerc *et al.*, 1996).

A une moindre concentration, elle est retrouvée dans la matière fécale de plusieurs animaux comme les bovins, les volailles, les porcs et les moutons (Leclerc *et al.*, 1996; Franz *et al.*, 1999; Wheeler *et al.*, 2002). *E. faecalis* est une espèce ubiquitaire dans l'environnement, très souvent retrouvée dans les boues de station d'épuration, les amendements organiques et les eaux usées (Kühn *et al.*, 2003; Da Silva *et al.*, 2006; Hölzel *et al.*, 2010). Elle est fréquemment retrouvée dans le sol et sur les végétaux (Mundt, 1961; Fujioka *et al.*, 1998; Byappanahalli *et al.*, 2012; Valenzuela *et al.*, 2012; Ran *et al.*, 2013). Comme pour *E. coli*, *E. faecalis* représente un indicateur de contamination fécale dans les eaux de boissons et les eaux de baignades (USEPA, 2004). La contamination des aliments par cette bactérie, notamment la viande et les produits laitiers se fait par *E. faecalis* porté par les animaux eux-mêmes (Franz *et al.*, 1999; Giraffa, 2002; Franz *et al.*, 2003).

Chez les personnes immunodéprimées, *E. faecalis* peut provoquer différentes infections telles que les infections urinaires, les infections de plaies chirurgicales, les endocardites, les bactériémies, et les méningites (Chenoweth et Schaberg, 1990; Jett *et al.*, 1994). La pathogénicité de cette espèce est liée à sa résistance à de nombreux antibiotiques (Murray, 1990; Hegstad *et al.*, 2010), et à de nombreux facteurs de virulence. Ces derniers sont en partie des protéines membranaires (adhésines, substances d'agrégation) permettant à la

bactérie d'adhérer aux cellules hôtes. De plus les substances sécrétées par la bactérie, telles que les cytolisines, les protéases et les toxines, lui confèrent la capacité de modifier la réponse immunitaire et inflammatoire de l'hôte et de causer des dommages tissulaires (Jett *et al.*, 1994; Fisher et Phillips, 2009). Les facteurs de virulences se trouvent à des proportions et à des combinaisons différentes en fonction de la souche et de son origine (cas cliniques, individus sains, environnement) (Duprè *et al.*, 2003; Creti *et al.*, 2004).

A ce jour, très peu de données sont disponibles concernant l'épidémiologie des entérocoques en Algérie, seulement quelques cas d'*Enterococcus* résistant à la vancomycine (VRE) ont été décrits pendant une dizaine d'années (Aggoune *et al.*, 2008).

I-3-2-5- *Bacillus cereus*

Le genre *Bacillus* est très hétérogène et englobe au minimum 36 espèces. Selon la forme de la spore, les *Bacillus* sont classés en 3 groupes : les bacilles à spore ovale non déformante, les bacilles à spore ovale déformante et les bacilles à spore ronde déformante.

Bacillus cereus est un long Bacille, Gram positif et mobile, pouvant être sporulés formant une spore non déformante. La bactérie est Aéro-anaérobie, et peut se développer à une température de 45°C, avec une température de croissance optimale de 37°C. Elle est catalase positive et oxydase variable. Elle forme une large hémolyse sur gélose au sang de mouton (Vilain *et al.*, 2006) (Figure 13).

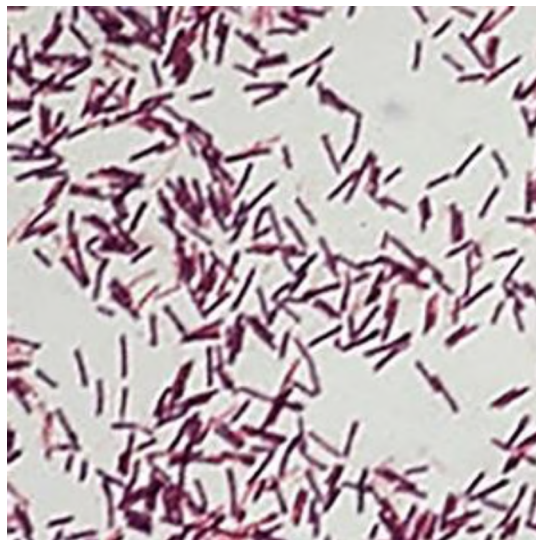


Figure 13 : photo d'une *Bacillus cereus* sous microscope photonique (Gr x 100)(EFSA, 2011)

Grace à leurs spores qui leur confèrent une grande résistance, les Bacilles sont ubiquitaires. Le principal réservoir étant les sols, on les retrouve également dans l'eau de mer, l'eau douce

et sur les plantes. On en trouve même dans les produits alimentaires ou médicamenteux stérilisés à cause de la thermorésistance des spores (**Jensen et al., 2003**).

Bacillus cereus provoque le plus souvent des intoxications alimentaires. Cependant chez les sujets immunodéprimés, elle peut occasionner des septicémies, des méningites, des infections respiratoires et des myonécroses (**Kotiranta et al., 2000**). C'est une bactérie qui résiste à un nombre important d'antibiotiques, et elle est connue par sa résistance à la pénicilline G, à l'amoxicilline, et aux céphalosporines (**Murray et al., 2007 ; Logan et Rodriguez-Diaz, 2006 ; Rosovitz et al., 1998**). Entre 2006 et 2010, cette espèce bactérienne a été impliquée dans 53% des cas d'intoxication dus à la consommation des pâtes (dont 25% avec la semoule ou le couscous). (**Cadel et al., 2012**).

I-3-2-6- *Clostridium botulinum*

Clostridium botulinum est une bactérie pathogène du genre *clostridium*, elle provoque une toxi-infection grave appelée Botulisme, qui affecte l'homme et l'animal. L'oxygène est toxique pour toutes les espèces de ce genre. *Clostridium botulinum* est un gros bacille, Gram positif, mobile, et productrice de spores. Ces bactéries peuvent résister à la pasteurisation et germer lorsque les conditions d'anaérobiose, de température et de pH deviennent favorables (**Shapiro et al., 1997**) (Figure14).



Figure 14 : photo d'une *Clostridium botulinum* sous microscope photonique (Gr x 100)(**Haeghebaert, 2003**)

Clostridium botulinum est une bactérie saprophyte très répandue dans le sol et les sédiments aquatiques (**Acha et Szyfres, 2001**). Le botulisme est causé par la toxine botulique, de nature protéique. Elle agit en bloquant l'acétylcholine au niveau de la jonction neuromusculaire provoquant ainsi des paralysies, se manifestant d'abord par des troubles de l'accommodation

et de la déglutition pour s'étendre ensuite aux muscles respiratoires. La toxine botulique représente l'une des toxines les plus actives, la dose mortelle pour l'homme est d'environ 1µg (Chao *et al.*, 2004). Cependant cette intoxication reste plus ou moins rare en Algérie (quelques dizaines de cas par an).

I-3-2-7- *Pseudomonas aeruginosa*

Comme toutes les espèces du genre *Pseudomonas*, ces bactéries ont des exigences nutritives peu importantes. En pathologie infectieuse, c'est l'espèce *P. aeruginosa* qui est la plus rencontrée (Fazeli *et al.*, 2012). *P. aeruginosa* est un bacille fin, Gram négatif, non capsulée, non sporulée et mobile. La bactérie n'a aucune exigence nutritive particulière, et sa croissance peut se faire sur des milieux non enrichis.

Sur le milieu de culture deux particularité caractérise cette espèce : un pigment vert brillant diffusible, dû à la combinaison de pyoverdine (pigment jaune vert fluorescent commun aux espèces du groupe fluorescens) et à la pyocyanine (pigment bleu spécifique de *P. aeruginosa*), ainsi qu'une odeur aromatique de type seringia qui est souvent présente. Cependant, certaines souches peuvent ne pas présenter une pigmentation à cause de la production de pyomélanine ou pyorubrine. Ces deux caractères permettent une orientation très rapide. Le mode respiratoire de *P. aeruginosa* est aérobie strict, elle est oxydase positive (sauf pour les colonies muqueuses). La température optimale de sa croissance est de 41°C. Elle produit de l'arginine dihydrolase, de la gélatinase, et de la nitrate réductase. (Fazeli *et al.*, 2012) (Figure 15).



Figure 15 : photo de *Pseudomona aeruginosa* sous microscope photonique (Gr x 100)(Kenneth, 2012)

Comme toutes les espèces du genre *Pseudomonas* ou apparentées, *P. aeruginosa* est une espèce bactérienne ubiquitaire. Elle peut faire partie de la flore transitoire de l'homme : flore digestive, cutanée, pharyngée. En milieu hospitalier, il est montré que le portage augmente avec la durée d'hospitalisation dans un environnement proche du malade (**Fazeli et al., 2012**).

P. aeruginosa est capable de survivre dans l'environnement, tel que les eaux, le sol, et l'air et particulièrement dans le milieu humide. C'est une espèce classée dans les pathogènes opportunistes. Les infections pourront avoir une origine endogène ou exogène.

Dans les infections nosocomiales, *P. aeruginosa* cause des pneumopathies chez les malades sous respirateur, des infections urinaires chez les malades sondés, des infections cutanées secondaires à des brûlures et des infections ostéo-articulaires sur matériel (**Flemming et al., 1994**). Elle est naturellement résistante à de nombreux β -lactamines via une mauvaise perméabilité membranaire, des mécanismes d'efflux actif et une production d'une céphalosporinase chromosomique inductible. Ainsi les β -lactamines actifs sur *P. aeruginosa* sont les carboxypénicillines (ticarcilline), les uréidopénicillines (pipéracilline), certaines céphalosporines (ceftazidime, cefépime), les carbapénèmes (imipénème, méropénème, doripénème), et les monobactams (aztréonam) (**Lister et al., 2009**).

Selon le 16ème rapport d'évaluation du réseau algérien de surveillance de la résistance bactérienne en 2015, on relève 21,76% (96/441) de *Pseudomonas aeruginosa* résistant à l'imipénème parmi les souches isolés en réanimation.

I-3-2-8- *Erwinia carotovora*

Plusieurs bactéries pathogènes peuvent aussi affecter la plante, ce qui représente une autre source de contamination pour l'homme. Parmi ces bactéries phytophagènes : *Erwinia carotovora* responsable de la pourriture molle bactérienne, maladie destructrice de fruits, de légumes, et de plantes ornementales (**Cruz et al., 2007**).

Erwinia carotovora, aussi appelée *Pectobacterium carotovorum*, est une bactérie appartenant à la famille des Entérobactériacés. Elle se présente sous forme de bâtonnets droits, Gram négatif et mobiles grâce à la disposition de flagelles tout autour de la cellule. Elle est capable de vivre en présence ou en absence d'oxygène et en présence d'eau. *Erwinia carotovora* est un parasite de faiblesse. La croissance de ces bactéries peut se faire entre 0 et 32° C, mais les températures optimales se situent entre 25 et 30° C. Les conditions de croissance idéales pour *Erwinia carotovora* sont une température élevée et une forte teneur en humidité (Figure 16).

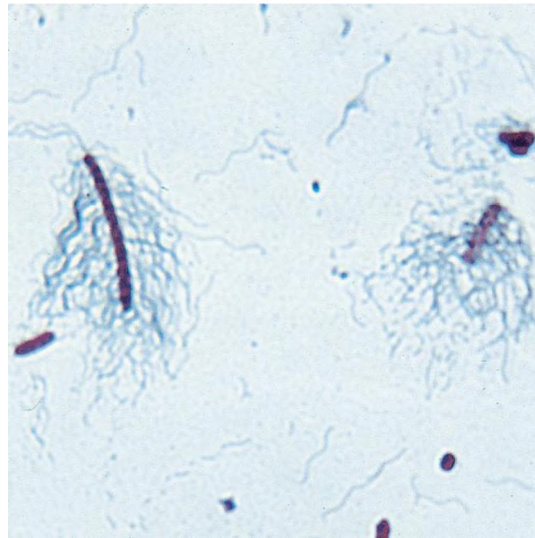


Figure 16 : photo d'une *Erwinia carotovora* sous microscope photonique (Gr x 100) (**Kettani Halabi, 2012**)

Erwinia carotovora se trouve principalement dans les régions tropicales et chaudes du monde. Elle se propage très rapidement et de diverses manières, en raison de son existence dans l'eau par l'intermédiaire d'aérosols et du ruissellement dans les cours d'eau (**Cruz et al., 2007**).

Lorsqu'une plante est infectée par *Erwinia carotovora*, les cellules lésées de la plante libèrent des liquides qui servent à nourrir la bactérie. Au cours de leur reproduction, les bactéries libèrent des enzymes pectolytiques qui dégradent et décomposent les parois cellulaires de la plante, ce qui provoque l'éclatement et la mort des cellules. Ainsi, la nourriture est davantage fournie aux bactéries qui continuent à se multiplier et à se déplacer dans les espaces intercellulaires (**Cruz et al., 2007**). Au cours de ces dernières années, une augmentation de maladies dues aux bactéries *Erwinia carotovora* a été constatée. Ce groupe de bactéries est classé parmi les agents pathogènes les plus importants économiquement pour la culture de pommes de terre (**Hélia, 2008**).

I-3-2-9- *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens, récemment renommée *Rhizobium radiobacter* est une bactérie appartenant à la famille *Rhizobiaceae*. C'est un bacille, gram négatif, mobile, et aérobie strict. *Agrobacterium tumefaciens* présente une capacité d'utilisation des glucides très étendue, sa température optimale de croissance s'étend de 24 à 28° C.

Dans un milieu de culture très favorable, leur temps de génération est d'environ 120 minutes. Elle résiste au sel de tellure, et à de nombreux antibiotiques de type bêta-lactame. (Goodner *et al.*, 2001) (Figure 17).

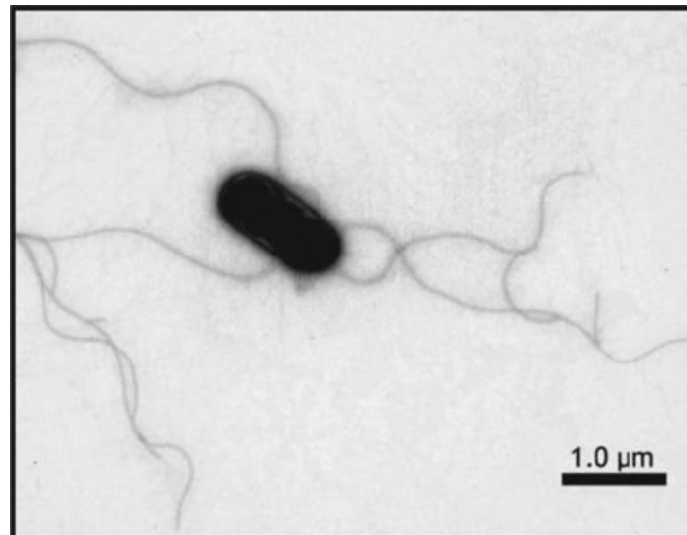


Figure 17 : photo d'une *Agrobacterium tumefaciens* sous microscope électronique (Collins, 2001)

Agrobacterium tumefaciens est une bactérie commune du sol et plus particulièrement du sol parcouru par les racines des plantes : le sol rhizosphérique. C'est une bactérie phytopathogène responsable d'une maladie appelée galle du collet (crown-gall) qui se manifeste par la formation d'une tumeur au site d'infection. *A. tumefaciens* a été identifiée à partir de galles en 1907 (Smith et Townsend, 1907).

Le mécanisme de formation des tumeurs ressemble à une transformation génétique, dû à un plasmide bactérien appelé plasmide Ti qui rend *Agrobacterium tumefaciens* virulente. Un fragment d'ADN de ce plasmide, l'ADN-T, est transféré de la bactérie vers la plante, pour intégrer le génome végétal où il induit la formation des galles caractérisés par la multiplication anarchique des cellules végétales. *Agrobacterium tumefaciens* infecte essentiellement les dicotylédones suite à une blessure (Goodner *et al.*, 2001).

En Algérie, la galle du collet a été observée dans 99% des pépinières des régions productrices d'arbres fruitiers. Parmi les 11 espèces d'arbres étudiées, les espèces les plus touchées étaient la pêche (5,39%), l'amande (3,43%), la cerise (1,50%), la pomme (1,47%) et l'olive (1,30%) (Bouzar *et al.*, 1991).

I-3-3- Persistance des bactéries pathogènes dans le sol

La capacité des bactéries pathogènes à survivre dans le sol présente un risque sanitaire important. Elles peuvent contaminer les récoltes si elles pénètrent dans le sol via la matière fécale des animaux porteurs, ou via l'eau d'irrigation ou les amendements organiques contaminés. Le sol peut ainsi agir comme vecteur de contamination et servir de réservoir intermédiaire à ces bactéries pathogènes. La capacité de survie de ces dernières dans le sol dépend de leur pouvoir d'adaptation à cet environnement. Elle est influencée par plusieurs facteurs liés à la nature du sol, aux microorganismes qui se trouvent dans ce sol et aux conditions environnementales (Reddy *et al.*, 1981; Crane and Moore, 1986).

I-3-4- Influence des paramètres physico-chimiques du sol sur la survie des bactéries**I-3-4-1- La texture du sol**

La texture du sol est l'un des facteurs fondamentaux influençant la survie des bactéries pathogènes (Jamieson *et al.*, 2002). En effet les sols argileux prolongent la survie de ces dernières plus que les sols sableux. A titre d'exemple, les bactéries *E. coli* O157, *Salmonella* et *L. monocytogenes* survivent plus de 32 jours dans un sol de prairie qui sont de nature argilo-limoneux mais moins de 32 jours dans un sol arable-sableux (Nicholson *et al.*, 2005). La même constatation a été faite pour *L. monocytogenes* dont la survie est stable dans un sol argileux alors qu'elle décline dans un sol sableux durant les 35 jours d'incubation (Dowe *et al.*, 1997). Pour *Salmonella spp*, des auteurs lui ont attribué une meilleure survie dans le sol argileux que dans le sol sablo-limoneux grâce à la teneur en matière organique et la capacité d'humidité plus élevée dans le sol argileux (Holley *et al.*, 2006).

Une autre étude réalisée sur l'effet de 3 types de sol (limoneux, limono-sableux et sableux) sur la survie d'*E. coli* et d'*Enterococcus spp* a démontré que *Enterococcus spp* persiste plus longtemps dans le sol limoneux, qui présente le plus fort pourcentage d'argile, et décline plus rapidement dans le sol sableux (Cools *et al.*, 2001).

I-3-4-2- Le pH

L'effet du pH sur la survie des bactéries pathogènes dans le sol n'a pas fait l'objet de plusieurs études. Le pH optimale pour la survie des bactéries est de 6 à 7 et décroît pour des pH acides ou basiques (Reddy *et al.*, 1981; Crane and Moore, 1986). En effet, *L. monocytogenes* peut survivre plus de 200 jours dans une certaine catégorie de sol, mais ne dépasse pas une semaine dans un sol de forêt. Certains auteurs attribuent ce déclin au faible pH du sol (pH de 5,2) (McLaughlin *et al.*, 2011).

I-3-4-3- Nutriments et matière organique

La survie des bactéries pathogènes dans le sol est étroitement influencée par la disponibilité de nutriments (**Crane and Moore, 1986; Jamieson et al., 2002**). La principale provenance de ces nutriments est la matière organique en décomposition (**Hattori et al., 1976**). L'apport de nouvelle substance au sol, telle que les amendements organiques, constitue un apport supplémentaire d'éléments nutritifs pour les microorganismes du sol. A titre d'exemple, *E. coli* et *E. faecalis* qui voient leur survie se prolonger dans le sol par l'apport croissant de matière organique par le biais des eaux usées brutes ou des boues de station d'épuration (**Mallmann and Litsky, 1951**). D'autres études prennent en considération la capacité d'échange cationique, l'influence de la concentration en cations, ainsi que le ratio de saturation en cations basiques sur la survie des bactéries dans le sol (**Kibbey et al., 1978; Zhai et al., 1995**). En effet, la croissance de *L. monocytogenes* et *Yersinia pseudotuberculosis* est stimulée dans un sol contenant de grandes concentrations en ions calcium et magnésium (**Sidorenko et al., 2006**). La mortalité de bactéries fécales telles que les coliformes totaux et fécaux est plus élevée dans un sol prélevé à une profondeur de 15 à 30 cm comparé à un sol prélevé en surface (**Zhai et al., 1995**).

I-3-4-4- Les pratiques agricoles

Les pratiques agricoles exercent une importante influence sur la survie des pathogènes dans le sol, en raison des modifications structurales qu'elles peuvent entraîner (tel le labour) ainsi que les modifications sur la chimie du sol (tel que l'ajout d'amendements). La pénétration des bactéries pathogènes dans le sol se fait par le biais d'amendements organiques ou l'eau d'irrigation. Or, ces bactéries telluriques ont des propriétés physico-chimiques différentes de celles du sol, ce qui pourrait modifier leur survie dans ce dernier. En effet, les fumiers et les lisiers possèdent des teneurs en matières organiques, des quantités d'azote et des pH diversifiés agissant différemment sur la survie des pathogènes dans le sol (**Nicholson et al., 2005**). Généralement les fumiers et les lisiers agissent en faveur de la persistance des bactéries pathogènes dans le sol par l'apport de nutriments (**Dazzo et al., 1973**), de matière organique (**Tate, 1978**) et d'azote (**Gagliardi and Karns, 2000**). Dans ce contexte, une étude a indiquée que la teneur en carbone et en azote organique dissous ainsi que celle en substrats carbonés facilement disponibles sont des paramètres prédictifs pour la survie d'*E. coli* O157:H7 dans le sol (**Franz et al., 2008**).

Ainsi, favoriser un environnement oligotrophique dans le sol pourrait donc réduire le risque de transmission d'*E. coli* dans celui-ci et ce en réduisant l'apport d'engrais minéraux et en

augmentant l'apport d'amendements organiques complexes (tel que le fumier et le compost) avec un ratio C/N élevé (**Van Bruggen et al., 2006**). Une autre étude a été faite en comparant l'effet du type de fumier sur la survie de deux bactéries pathogènes, *E. coli* O157:H7 et *Salmonella Thyphimurium*. Ces 2 bactéries survivent 15 jours dans des sols amendés avec de l'urine humaine et 90 jours dans des sols amendés avec du fumier de volaille. Tandis que leur temps de survie dans les sols amendés avec du lisier de bovin est intermédiaire. Le temps prolongé de la survie des deux pathogènes en présence du fumier de volaille est lié à une teneur élevée en matière organique protégeant ainsi les bactéries de l'environnement oligotrophique du sol et leur attribue une plus grande surface pour échapper à la prédation et à la compétition des microorganismes natifs du sol (**Nyberg et al., 2010**).

I-3-5- Influence des paramètres biotiques du sol

I-3-5-1- Les microorganismes totaux

Une fois les bactéries pathogènes pénètrent dans un sol, un phénomène de compétition pour l'utilisation des éléments nutritifs et pour la colonisation des microhabitats avec la flore existante du sol est mis en jeu. En comparant la survie des bactéries pathogènes dans un sol stérile et non stérile, le rôle des microorganismes indigènes du sol a été mis en évidence par une nette amélioration de la survie des pathogènes dans des fumiers et des sols stérilisés, ne contenant aucun microorganisme (**Jiang et al., 2002; You et al., 2006; McLaughlin et al., 2011**). La même observation a été faite pour *E. coli* O157:H7 dont la croissance décroît rapidement dans un sol amendé non-stérile à différentes températures d'incubation (5°C, 15°C et 21°C) (**Jiang et al., 2002**). La croissance de *L. monocytogenes* introduite dans des sols non stériles décroît avec le temps, alors qu'elle augmente et/ou se maintient dans les mêmes sols stériles (**Botzler et al., 1974; Dowe et al., 1997; McLaughlin et al., 2011**).

I-3-5-2- Les communautés bactériennes

Pour observer l'effet de la communauté bactérienne sur la survie des bactéries pathogènes dans le sol, une modification de cette dernière a été réalisée. Dans une étude de ce genre, les communautés bactériennes d'un sol ont été extraites par plusieurs lavages et diluées en série puis réintroduites dans des microcosmes contenant le même sol stérilisé (**van Elsas et al., 2012**).

Une étude réalisée par **Van Elsas et al. (2012)** a montré la survie d'*E. coli* O157:H7 est élevée dans les microcosmes de sols qui contiennent la plus faible intensité en communautés

bactériennes et diminue dans le sol non stérile. Ainsi, la diversité des bactéries dans le sol est un facteur important contrôlant la capacité des pathogènes à persister dans celui-ci.

I-3-5-3- Les protozoaires

Les protozoaires sont très répandus dans les milieux aquatiques et les sols. Ils participent à la régulation des populations bactériennes dans les sols. Selon **Garcia et al. (2010)**, les protozoaires développent clairement un phénomène de prédation à l'égard de *S. Typhimurium*. Une étude menée par **Bui et al. (2012)** a suivi la survie de 3 bactéries pathogènes, *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* et *Campylobacter jejuni* mis en culture avec le protozoaire *Cercomonas sp.* Ces auteurs ont constaté un développement de ce dernier en présence de *S. Typhimurium* et *C. jejuni* mais pas en présence de *L. monocytogenes*. Ce qui les laisse suggérer une relation d'échange de bénéfices où ce protozoaire se nourrit des bactéries en prolongeant la survie de *S. Typhimurium* et *C. jejuni*, se servant de structure protectrice et de véhicule de dissémination.

I-3-6- Influence des paramètres environnementaux

I-3-6-1- La température

La survie des bactéries pathogènes dans le sol dépend étroitement de la température (**Reddy et al., 1981**). D'une manière générale la température du sol est inférieure à la température optimale de croissance des pathogènes, et leur survie est prolongée à des températures proches de 5°C (**Garcia et al., 2010**). Ces derniers ont révélé que *S. Typhimurium* persiste plus longtemps dans des microcosmes de sols incubés à 5°C qu'à 15°C et 25°C. La même observation a été faite pour *S. Enteritidis* dont la survie décroît rapidement à 35°C et atteint sa limite au bout de 28 jours alors qu'elle est maintenue plus de 140 jours à une température de 20°C (**Danyluk et al., 2008**).

Le taux de mortalité d'*Enterococcus spp.* et d'*E. faecalis* diminue également pour de faibles températures (**Kibbey et al., 1978**).

I-3-6-2- L'humidité

La disponibilité en eau est l'un des principaux facteurs influençant la survie des bactéries pathogènes dans le sol (**Reddy et al., 1981**). Dans un sol, la teneur en eau varie en fonction de sa composition, de la pluviométrie, de l'écoulement de l'eau et de la couverture végétale. Généralement, les sols humides sont plus favorables à la survie des bactéries pathogènes.

comparés aux sols secs. Ceci a été démontré dans plusieurs études. En effet, *L. monocytogenes* persiste 70 jours dans des sols où l'humidité, diminue au cours du temps tandis qu'elle survie plus de 200 jours dans des mêmes sols où l'humidité est maintenue constante (Welshimer, 1960). La survie des souches d'*E. coli* non pathogènes et *E. coli* O157:H7 décline dans des sols pauvres en eau (Mubiru *et al.*, 2000). Dans le même contexte la survie d'*E. faecalis* chute rapidement dans des sols humidifiés à 50%, alors qu'elle se maintient plus longtemps dans des mêmes sols où l'humidité est proche de la saturation (Kibbey *et al.*, 1978).

D'autres études ont combinées l'effet du couple température-humidité sur la survie des bactéries pathogènes dans le sol, aboutissant à conclure qu'une faible température associée à un taux d'humidité élevé du sol favorise la survie de plusieurs bactéries pathogène telles qu'*E. coli*, *Salmonella spp.* et *Enterococcus spp.* (Kibbey *et al.*, 1978; Cools *et al.*, 2001; Holley *et al.*, 2006).

I-3-7- Transfert des bactéries pathogènes telluriques

Lorsque les conditions physico-chimiques en humidité, pH et nutriments sont adéquates, le sol peut assurer la survie des bactéries pathogènes et constituer un réservoir pour ces dernières, qui se fixent sur les particules du sol pour y être retenues. Cependant, les bactéries pathogènes peuvent être transférées sur différents autres substrats tels que les matières premières végétales mais aussi migrer dans le sol et contaminer les ressources en eau de surface et en eau souterraine. Ainsi, le sol représente pour l'homme un vecteur de contamination directe par la manipulation du sol contaminé ou indirecte par le biais de transfert possible de ces pathogènes aux fruits et légumes et aux ressources en eau (Locatelli, 2015).

I-3-7-1- Transfert aux graines des végétaux

Le transfert des bactéries pathogènes du sol aux végétaux peut se faire soit de manière directe, par contact entre le sol contaminé et les graines, ou de manière indirecte, par les projections d'eau de pluie ou d'irrigation tombant sur le sol. Ainsi, ces pathogènes peuvent survivre à la surface des végétaux, s'y multiplier et s'implanter dans leurs tissus (Brandl, 2006 ; Deering *et al.*, 2012). La contamination des végétaux peut survenir à un stade précoce, le stade de la graine, lorsque celle-ci entre en contact avec le sol. Ceci a été démontré par plusieurs auteurs. (Vanrenterghem *et al.*, 1991; Solomon *et al.*, 2002). Les tissus extérieurs des semis puis des plantes sont rapidement colonisés après la contamination des graines

(Kutter *et al.*, 2006). L'inoculation de graines de différents produits maraichers par des suspensions bactériennes d'*E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium* et *L. monocytogenes* a abouti à une importante multiplication de ces pathogènes, avec quelques différences observées entre les espèces (Islam *et al.*, 2004b et 2005; Jablason *et al.*, 2005). D'autre part, la saison d'amendement du sol a un effet sur la capacité des pathogènes à contaminer les végétaux. Peu de légumes apparaissent contaminés durant la période de mars à août (Natvig *et al.*, 2002).

I-3-7-2- Transfert par les eaux de pluie

Très peu d'études se sont consacrées pour la détermination du transfert des bactéries pathogènes du sol aux végétaux par la projection d'eau de pluie ou d'eau d'irrigation. Une expérience a été réalisée avec des plantules de persil plantées dans un sol contaminé avec *Listeria innocua* puis stimulée par une chute de pluie ou une irrigation par aspersion. Les parties aériennes du persil ont été contaminées par *L. innocua* dont le nombre décroît lorsque le point d'impact entre le sol et l'eau s'éloigne de la plante (Girardin *et al.*, 2005). Une autre étude a démontré que la quantité d'*E. coli* transportée par projection est plus importante lorsque le volume des gouttes augmente. Une goutte d'eau de 24-87 µl peut propulser ce pathogène présent dans le sol à une distance horizontale de 25 cm et une hauteur de 20 cm (Monaghan et Hutchison, 2012).

I-3-7-3- Internalisation des pathogènes par les végétaux

Bien qu'un simple rinçage à l'eau peut éliminer la plupart des bactéries pathogènes présentes à la surface des fruits et légumes, la contamination pré ou post-récolte de ces derniers peut aboutir à l'internalisation des pathogènes au sein de leurs tissus (Erickson, 2012). Pour les bactéries pathogènes l'internalisation est une manière de protection contre tous les traitements de lavage après la récolte.

Le phénomène d'internalisation survient par inoculation des fleurs, des feuilles et des tiges par les bactéries pathogènes via les stomates (Guo *et al.*, 2001; Kroupitski *et al.*, 2009; Deering *et al.*, 2012). Par contre, l'internalisation de ces bactéries se fait par le système racinaire si le sol est contaminé. Peu de temps après la germination de graines inoculées avec *E. coli* O157:H7, l'internalisation de cette dernière est mise en évidence dans des tissus de plantules de laitue, ce qui suggère sa migration à l'intérieur de la plante (Solomon *et al.*, 2002). Le phénomène d'internalisation de bactéries pathogènes par le système racinaire a aussi été démontré sur des plants de tomates cultivés dans une solution nutritive contenant *Salmonella spp.* Cette dernière est détectée par la suite dans les feuilles et les tiges des

tomates, ce qui confirme l'hypothèse du transport du pathogène par voie systémique dans les plants de tomates (Guo *et al.*, 2002). L'internalisation des bactéries pathogènes dans les tissus des plantes est un processus assez complexe dépendant du type de la plante, de son mode de culture et aussi de la souche bactérienne (Hirneisen *et al.*, 2012).

I-4-4- Transfert par transport vertical dans le sol

Le nombre de bactéries pathogènes transportées verticalement est lié d'une part au débit d'eau apportée à la surface du sol et d'autre part aux caractéristiques physicochimiques de ce dernier. Il est connu que le taux le plus élevées des bactéries pathogènes apportée par les amendements se trouve à la surface du sol et diminue en profondeur (Gagliardi et Karns, 2000; Semenov *et al.*, 2009; Bech *et al.*, 2010). Cependant, *S. Typhimurium* peut migrer plus profondément dans un sol limoneux structuré comparée à un sol sableux moins structuré (Bech *et al.* 2010). Les coliformes fécaux migrent également plus profondément dans un sol limoneux que dans un sol sableux (Unc et Goss, 2003). Ce sont donc les sols argilo-limoneux à faible porosité, constitués d'un réseau de macropores, qui favorisent la migration des bactéries pathogènes (Bech *et al.*, 2010; Brennan *et al.*, 2010).

I-4-5- Transfert par ruissellement et transport horizontal dans le sol

Les bactéries pathogènes se déplacent horizontalement dans les sols imperméables ou saturés en eau. La pluie ou l'irrigation peuvent provoquer un ruissellement d'eau à la surface du sol pouvant entraîner les pathogènes jusqu'au plans d'eau destinés à la consommation, aux loisirs ou à l'irrigation (Mawdsley *et al.*, 1995; Tyrrel et Quinton, 2003). Ce déplacement horizontal est influencé par quelques facteurs tels que les précipitations et la topographie du terrain (Mawdsley *et al.*, 1995). Il existe une différence entre les eaux de ruissellement provenant d'une zone pâturée ou non pâturée. En effet dans une eau provenant de la zone pâturée, le nombre de coliformes fécaux est 5 à 10 fois supérieur à celui qui se trouve dans une eau provenant de la zone non pâturée (Reddy *et al.*, 1981; Baxter-Potter et Gilliland, 1988; Jamieson *et al.*, 2002). En général, la présence de coliformes fécaux dans un sol non amendé est un indice d'une contamination non-agricole (Patni *et al.*, 1985). Les bactéries pathogènes sont aussi mobilisées et transportées par ruissellement des eaux pluviales urbaines de sources non ponctuelles jusqu'à la surface des plans d'eau telles que les rivières, les lacs et les plages (Fernandez-Alvarez *et al.*, 1991; Noble *et al.*, 2006; Sercu *et al.*, 2008).

Il existe une corrélation significative entre les périodes de précipitation extrême et l'apparition de maladies d'origine hydrique attribuables à des agents pathogènes (**Curriero et al., 2001**).

I-4-6-Transfert des bactéries pathogènes du sol vers les ressources en eau

Un problème très commun est celui du transport des bactéries pathogènes vers des réserves d'eau potable (puits par exemple), ce qui représente une importante source de contamination. Cette dernière est étroitement liée aux exploitations agricoles. En effet, une eau potable contaminée par des bactéries pathogènes pourrait être une importante source d'épidémie, telle que celle observée en Mai 2000 dans la ville de Walkerton (Ontario, Canada), où un réseau d'eau municipal a été contaminé avec *Escherichia coli* O157: H7 et *Campylobacter jejuni*, aboutissant à l'intoxication de 2300 personnes et le décès de 7 d'entre elles. L'investigation sur les causes de la contamination de l'eau a indiquée que l'origine était l'infiltration et le transport des bactéries pathogènes d'un sol amendé par du fumier au puits municipal (**O'Connor, 2002**).

CHAPITRE II

MATERIELS ET METHODES

Ce présent travail a pour visée l'évaluation de l'activité antibactérienne des flavonoïdes et des huiles essentielles de la plante médicinale *Euphorbia guyoniana* sur des bactéries pathogènes ayant pour habitat le sol. Pour se faire et dans une première démarche, une étude phytochimique est réalisée, suivie d'une extraction des flavonoïdes et des huiles essentielles. La deuxième démarche consiste à isoler et identifier des souches bactériennes pathogènes à partir de différents types de sol. Quant à la troisième démarche, elle consiste à l'évaluation des extraits sur les souches bactériennes isolées. L'expérimentation est réalisée au niveau du laboratoire de Valorisation et Conservation des Ressources Biologiques (VALCOR) de l'université M'Hamed Bougara de Boumerdès et du laboratoire d'hygiène de la Wilaya de Boumerdès.

II-1- Matériel végétal

Euphorbia guoniana a été récoltée en mois de Février 2016 pour l'extraction des flavonoïdes et en mois de Février 2017 pour l'extraction des huiles essentielles, dans la région de Ghardaïa (El Guerara) (Sud Algérien) (Figure 18). Il est important de noter que la période choisie pour la récolte représente la période de floraison de l'espèce.

Le climat à Ghardaïa est dit désertique. Au cours de l'année, il n'y a pratiquement aucune précipitation (68 mm par an) et la température moyenne est de 21°C (**Köppen et Geiger, 2001**).

L'identification botanique de l'espèce a été réalisée au niveau du laboratoire botanique de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie (ENSA) d'El-Harrach (Algérie). Toutes les parties de la plante (aériennes et souterraines) ont été utilisées. Le choix de cette espèce est basé sur son endémisme et sur la rareté des travaux valorisant ses bienfaits.

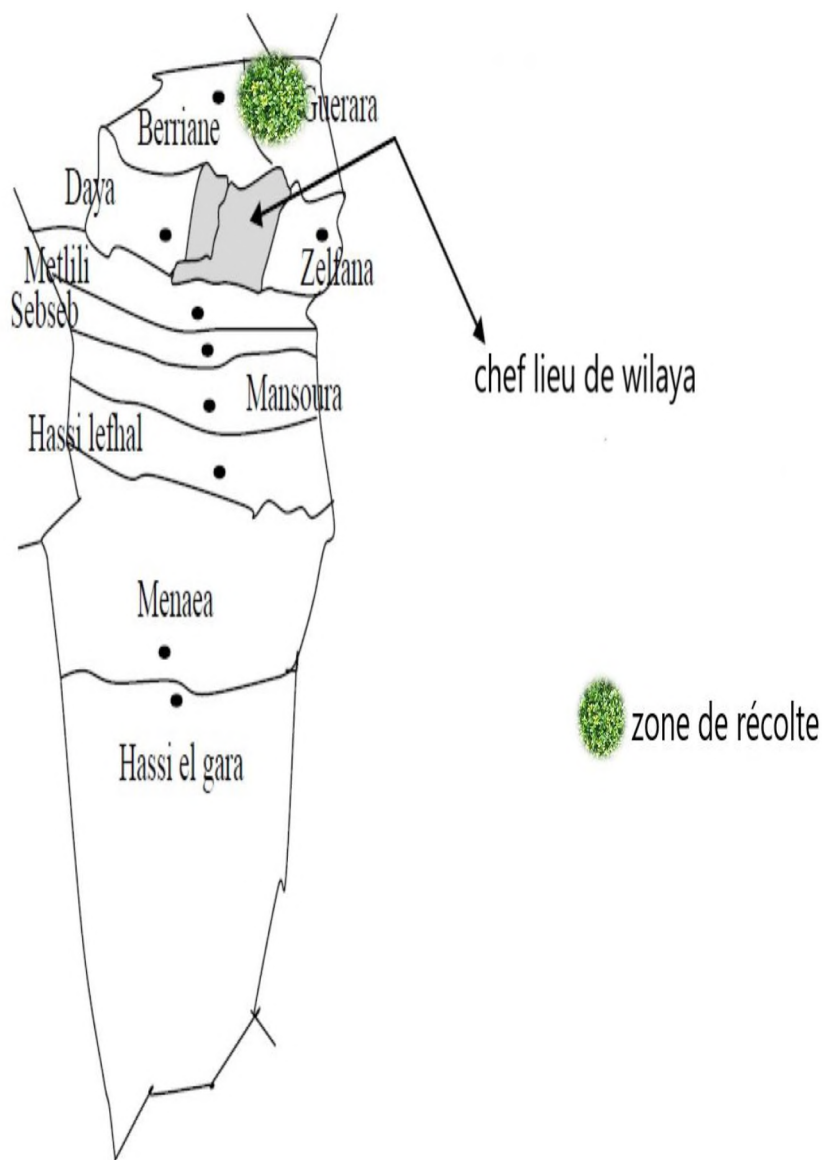


Figure 18 : zone de récolte de la plante *Euphorbia guyoniana* (Ghardaïa) (ONS, 2008)

Afin d'extraire les flavonoïdes, la plante a été séchée à l'air libre et en obscurité, puis broyée avec un broyeur électrique. La poudre ainsi obtenue est conservée dans un flacon hermétiquement fermé jusqu'au moment de l'utilisation. Pour l'extraction des huiles essentielles, la plante fraîchement récoltée a été utilisée.

II-2- Tests phytochimiques (Screening phytochimique)

Les tests phytochimiques réalisés sur la plante ont pour objectif de rechercher les substances bioactives, en utilisant une série de méthodes colorimétriques. Ils sont effectués

soit sur la poudre de la plante, soit sur son infusé à 5 %. Les méthodes de caractérisation utilisées dérivent de celle décrites par **Paris et Nothis (1978)**, **Tona et al., (1998)** et **Longanga et al. (2000)**.

II-2-1- Préparation de l'infusé à 5%

L'infusé à 5% est préparé par l'ajout de 5g de poudre végétale à 100 ml d'eau distillée chaude. Après 15 à 20 minutes de contact, la solution est filtrée à l'aide d'un papier filtre, puis le filtrat obtenue est ajusté à 100ml d'eau distillée.

II-2-2- Identification des anthocyanes

Elle est réalisée par l'addition de quelques gouttes d'HCl à 5 ml de l'infusé. L'apparition d'une coloration rouge est signe de la présence de ces métabolites dans la plante.

II-2-3- Identification des leuco-anthocyanes

Pour ce métabolite, 2 g de la poudre végétale sont additionnée à 20 ml d'un mélange de Propanol/Acide chlorhydrique (v/v). Le mélange est porté à ébullition dans un bain marie pendant 15 minutes. Le développement d'une coloration rouge indiquera la présence des leuco-anthocyanes.

II-2-4- Identification des tanins

À 5 ml de l'infusé, on ajoute quelques gouttes d'une solution de FeCl_3 à 5 % (Annexe 1). La coloration bleuâtre ou bleue noire indique la présence des tanins.

II-2-5- Identification des tanins catéchiques

L'identification des tanins catéchiques se fait par l'ajout de 15 ml d'infusé à 7 ml de réactif de Stiansy (Annexe 1). Une coloration rouge se traduit par la présence de ces métabolites.

II-2-6- Identification des tanins galliques

2 g d'acétate de sodium et quelques gouttes de FeCl_3 sont ajouté à 5 ml de l'infusé. En présence de tanins gallique la réaction donne une coloration bleu foncé.

II-2-7- Identification des quinones libres

2 g de la poudre humectés par 2 ml d'HCl, sont mis en contact avec 20 ml de chloroforme pendant 3 heures. Le filtrat est agité avec 5 ml d'ammoniaque 1/2. Une coloration rouge indique la présence des quinones libres.

II-2-8- Identification des saponosides

L'identification des saponosides nécessite l'addition de quelques gouttes d'acétate de plomb à 2 ml de l'infusé. La formation d'un précipité blanc indique l'existence des saponosides.

II-2-9- Identification des alcaloïdes

5 g de poudre humectés avec l'ammoniaque 1/2 sont macérés pendant 24h dans 50 ml d'un mélange éther-chloroforme (3v/v). Le filtrat est épuisé par l'acide chlorhydrique 2N. Des réactions de précipitations sont réalisées sur la solution chlorhydrique puis on rajoute quelques gouttes de solution Dragendroff (Annexe 1). Ce dernier donne un précipité rouge en présence des alcaloïdes.

II-2-10- Identification des coumarines

2 g de la poudre sont bouillis dans 20 ml d'alcool éthylique pendant 15 minutes puis filtrer. 10 gouttes de la solution alcoolique de KOH à 10% plus quelques gouttes d'HCl à 10% sont rajoutées à 5 ml du filtrat. La formation d'un trouble indique l'existence de coumarines.

II-2-11- Identification de l'amidon

À 2 g de poudre végétale, on rajoute quelques gouttes d'iode (I_2). Une coloration bleue violette indique la présence d'amidon.

II-2-12- Identification des flavonoïdes

5 ml d'HCl, un copeau de Mg et 1 ml d'alcool iso-amylque sont ajoutés à 5 ml de l'infusé. La présence de flavonoïdes se manifeste par une coloration rouge.

II-2-13- Identification des mucilages

Ajouter 5 ml d'alcool absolu à 1 ml de l'infusé. La présence de mucilage se traduit par l'apparition d'un précipité floconneux.

II-2-14- Identification des irridioïdes

À 2 ml de l'infusé, on rajoute quelques gouttes de l'acide chlorhydrique et on chauffe le mélange sur une plaque chauffante. L'existence des irridioïdes se manifeste par l'apparition d'une coloration bleue.

II-2-15- Recherche des Protéines

1g de poudre végétale est dissoute dans 2 ml d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 20%. On rajoute quelques gouttes de CuSO_4 à 2%. La réaction donne une coloration violette avec une teinte rougeâtre en présence de protéine.

II-2-16- Recherche des Lipoïdes

5 g de poudre végétale sont macérés dans 30 ml d'éther de pétrole pendant 30 minutes. Après filtration, évaporer le filtrat sur plaque chauffante. Ajouter au résidu graisseux 3 gouttes de H_2SO_4 . Une coloration violette signifie une réaction positive.

II-2-17- Recherche des Sucres réducteurs

5 ml de réactif de Fehling sont ajoutés à 5ml de l'infusé. La formation d'un précipité rouge brique après 3 minutes de chauffage au bain-marie indique une réaction positive.

II-2-18- Recherche des Glucosides

Quelques gouttes de H_2SO_4 sont additionnées à 2 g de poudre végétale. La formation d'une coloration rouge brique ensuite violette indique la présence des Glucosides.

II-2-19- Recherche des Caroténoïdes

A 10 ml de l'infusé, on ajoute 3 ml d'HCl et 3 ml de H_2SO_4 . La présence de Caroténoïdes se traduit par une coloration Vert-bleu.

II-2-20- Recherche des Polyphénols

Une goutte de chlorure ferrique (FeCl_3) à 2% est ajoutée à 2 ml de l'infusé. La présence des polyphénols se traduit par une coloration bleue-noirâtre ou vert foncé.

II-3- Procédure d'extraction des flavonoïdes

Pour l'obtention des flavonoïdes, nous avons adopté la méthode d'extraction de **Markham (1982)**, avec modification inspirée de la méthode de **Bruneton (1999)**, basée sur le degré de solubilité des flavonoïdes dans les solvants organiques (Figure 19). Seul le dernier extrait (extrait aqueux) a fait l'objet d'analyse chromatographique et biologique, en raison de sa richesse en flavonoïdes très polaires. Le rendement des différents extraits obtenus est calculé comme suit:

$$R\% = \frac{M - M_0}{M_t}$$

Tel que:

R%: Rendement de la matière extraite ;

M: Masse du ballon contenant l'extrait ;

M₀: Masse du ballon vide ;

M_t: Masse végétale totale utilisée dans l'extraction.

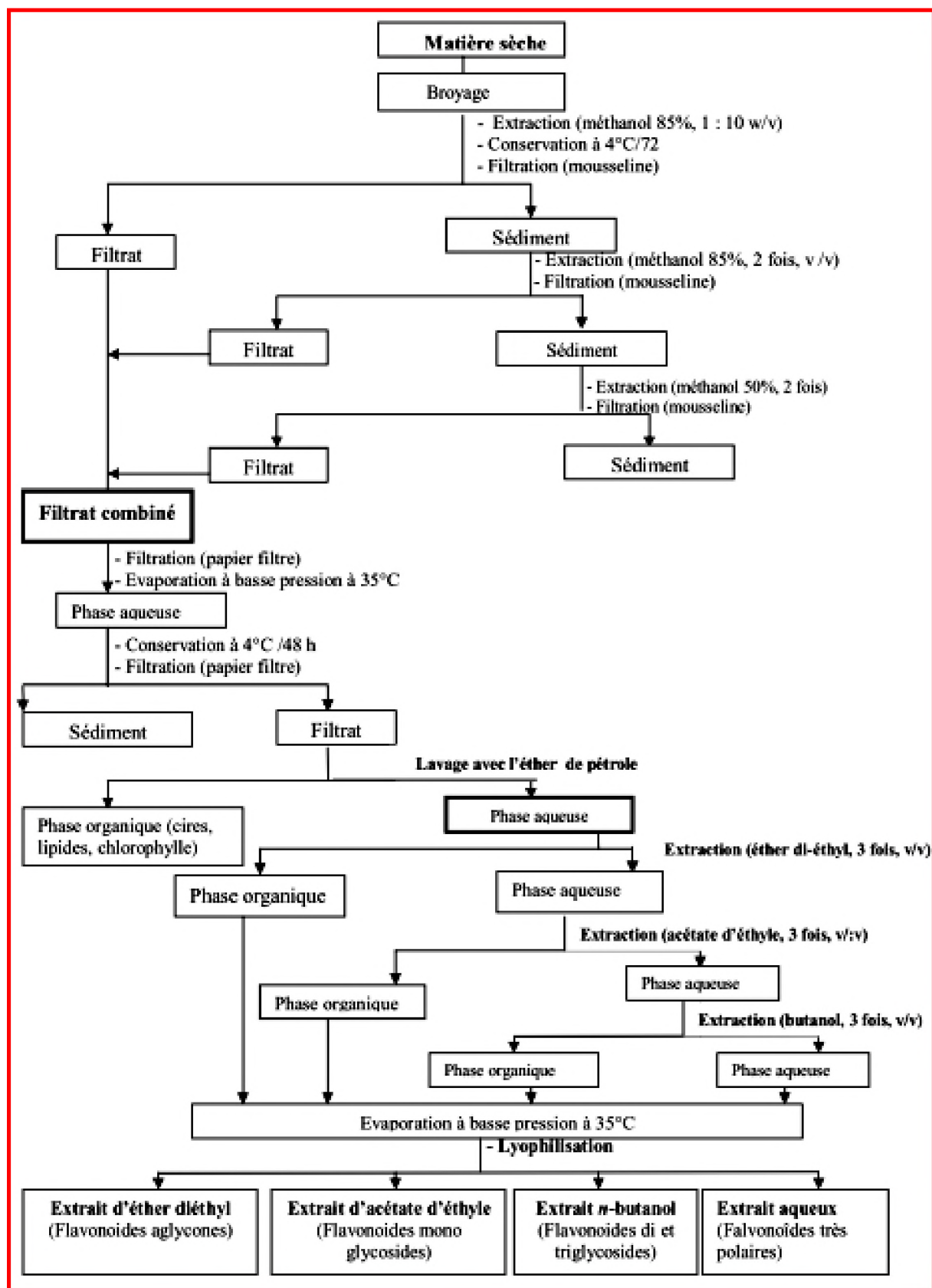


Figure 19: protocole d'extraction des flavonoïdes (Bruneton, 1999)

II-3-1- Détermination de la teneur totale en flavonoïdes par spectrophotomètre

L'évaluation quantitative des flavonoïdes a été évaluée dans les différentes fractions flavonoïdiques. Elle est réalisée selon la méthode de trichlorure d'aluminium AlCl_3 décrite par **Djeridane et al. (2006)** et **Ayoola et al. (2008)**.

Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre, en position 5 qui est susceptible de donner avec le groupement CO un complexe coloré en présence de chlorure d'aluminium. Ils forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (fer et aluminium). Ceci traduit le fait que le métal (Al) perd deux électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygène de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons.

Le test consiste à mettre 1ml de chaque échantillon dans 1ml d' AlCl_3 à 2%. Le mélange est vigoureusement agité, et incubé à température ambiante pendant 10 minutes, et l'absorbance est lue à 430 nm, avec un spectrophotomètre (Optizen 2120 UV, Korea) (Figure 20). La quantification des flavonoïdes se fait en fonction d'une courbe d'étalonnage réalisée par un flavonoïde standard (la quercétine). Les résultats obtenus sont représentés dans une courbe d'étalonnage, ayant l'équation suivante:

$$Y = 11,384x + 0,1036$$

$$R^2 = 0,9938$$

La teneur en flavonoïdes est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme de poids de l'extrait (mg EQ/g).

II-3-2- Identification des groupements fonctionnels des extraits flavonoïques par**Infrarouge**

La spectroscopie infrarouge repose sur le principe que chaque groupement chimique absorbe la lumière différemment en fonction de sa longueur d'onde. Les zones d'absorption (zone où la lumière est absorbée) permettent donc d'identifier les groupements fonctionnels (**Fontage et Chauchard, 2009**). Le spectre infrarouge de l'extrait flavonoïque, pour une gamme de fréquence comprise entre 400 et 4000 cm^{-1} , a été obtenu par un spectromètre de type NICOLET 560.

II-3-3- Evaluation qualitative des flavonoïdes par Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC)

Le principe de cette méthode repose sur la séparation des molécules à travers une phase stationnaire spécifique. En effet, dans une colonne chromatographique, les différentes molécules interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire en fonction de leur nature. Le système chromatographique est parcouru par une phase mobile poussée sous haute pression par une pompe. Le mélange à analyser est injecté puis transporté dans le système chromatographique. La répartition des composés en solution se fait en fonction de leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire.

L'appareillage utilisé pour l'analyse qualitative de l'extrait aqueux est constitué d'un chromatographe en phase liquide de marque Young line YL9100, équipé d'une pompe quaternaire YL 9101 avec dégazeur intégré YL 9101, d'un détecteur UV/Visible YL 9120 et d'un four YL 9131. La colonne employée est Agilent eclips XDB C 18 (5µm) d'une longueur de 25 cm et d'un diamètre intérieur de 4,6 mm. La phase mobile est un mélange d'eau ultra pure/acetonitrile/acide acétique en système isocratique avec un débit de 1ml/min. Le volume d'extrait et de standards injecté est de 20µl. La détection des composés est faite avec un détecteur UV à une longueur d'onde de 280- 320 nm. L'identification des flavonoïdes se fait par comparaison de leurs temps de rétention par rapport aux standards correspondant et par leurs spectres UV obtenus avec le détecteur.

II-4- Procédure d'extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles à partir de la matière végétale est réalisée par hydrodistillation, en se basant sur la différence de densité (**Aristidou, 2000**). Ainsi, 100g de la matière végétale fraîche constituée de la plante entière (feuille, tige, fleur, racine) est introduite dans un ballon rempli de 600ml d'eau distillée (Figure 20). L'ensemble est porté à ébullition pendant 3 heures. Durant cette opération, la vapeur chargée d'eau et d'huile traverse un réfrigérant incliné et se condense. Le distillat s'écoule goutte à goutte et est recueilli dans une ampoule à décanter. La séparation entre la phase organique représentée par l'huile essentielle et la phase aqueuse représentée par l'eau aromatique est réalisée en ajoutant l'éther di-éthylique. Enfin, l'huile essentielle est récupérée dans un flacon en verre stérile enveloppée avec du papier aluminium et conservée au réfrigérateur à une température comprise entre 4 et 6°C pour éviter toute dégradation des huiles essentielles. Au total, quatre extractions sont réalisées afin d'obtenir une quantité suffisantes pour réaliser les différents tests.

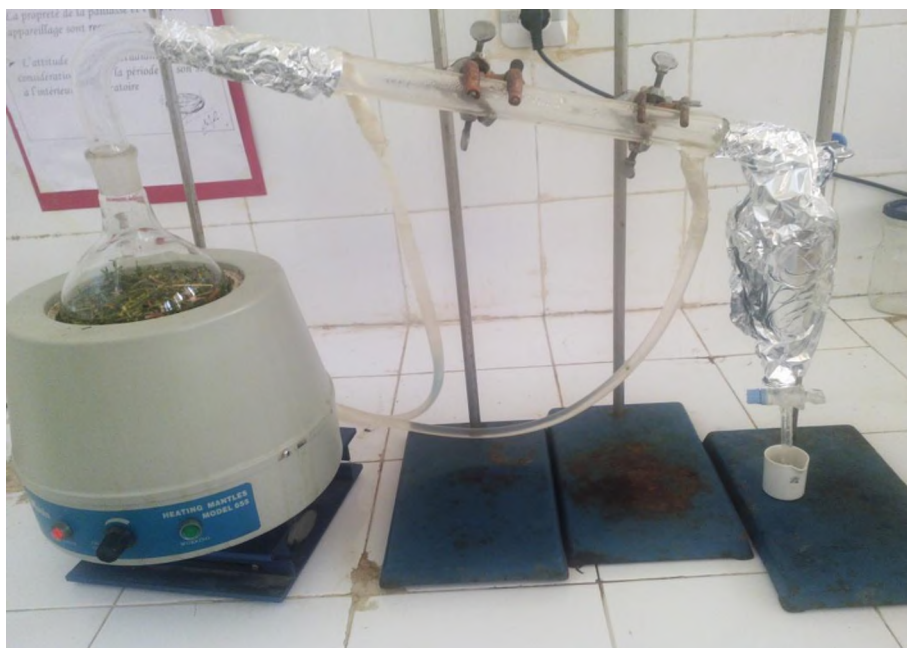


Figure 20 : dispositif d'hydrodistillation

II-4-1- Rendement de l'extraction

Le rendement en huile essentielle est le rapport entre le poids de l'huile extraite et le poids de la plante utilisée (Bekhichi et Abdelouahid, 2001). Le rendement, exprimé en pourcentage, est calculé par la formule suivante :

$$R\% = (P_B/P_A) \times 100$$

Tel que :

R : rendement de l'huile en %

P_B : poids de l'huile en g

P_A : poids de la plante en g

II-4-2- Caractérisation de l'huile essentielle par GC-SM

La détermination de la composition chimique de l'huile essentielle extraite de la plante *Euphorbia guyoniana* a été faite par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse de type Chromatographe en phase gazeuse Agilent 6890 couplé au

spectromètre de masse Agilent 5973 et au logiciel Agilent Chemstation, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, États-Unis, avec les conditions opératoires suivantes:

- Une colonne HP-5MS (5% Phenyl Methyl Silox, 30 m × 250 µm × 0.25 µm).
- Le gaz vecteur est l'Hélium.
- Un débit de 0.9 ml/ min.
- Une température de 35° C pendant 5 min, 35 à 150° C à 5° C/min, 150 à 250° C à 20° C/min, 250° C pendant 2 min.
- La température de l'injecteur est de 220°C.
- Le volume de l'huile à injecter est de 0,1 µl.

L'identification des différents composants a été faite par Le logiciel MassHunter.

II-4-3- Analyse des paramètres organoleptiques et physico-chimiques de l'huile essentielle

II-4-3-1- Détermination des paramètres organoleptiques

Les caractéristiques organoleptiques recherchées sont l'aspect (solide ou liquide), la couleur et l'odeur de l'huile essentielle (la nature du composé olfactif) (AFNOR, 2000).

II-4-3-2- Caractéristiques physiques

a- Détermination de la densité relative à 20° C

La densité relative d'HE est le rapport de la masse (g) d'un certain volume d'HE à la masse d'un volume égal d'eau distillée. Il s'agit de prendre un certain volume d'eau distillée à l'aide d'un pycnomètre et de prendre le même volume d'HE.

Pour mesurer la densité relative de l'HE, nous avons utilisé un pycnomètre de 1,5 ml. La procédure consiste à pesé le pycnomètre vide, rempli d'eau distillée et rempli d'HE. La densité relative est calculée par la formule suivante (AFNOR, 2000):

$$d_{20} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

Tel que:

m₀ : la masse, en grammes, du pycnomètre vide ;

m₁: la masse, en grammes, du pycnomètre rempli d'eau distillée ;

m₂ : la masse, en grammes, du pycnomètre rempli de l'huile.

b- Détermination de l'indice de réfraction

Le calcul de l'indice de réfraction d'une huile essentielle permet de vérifier la pureté de cette dernière mais aussi de vérifier la qualité de la distillation. En effet, l'indice de réfraction d'une huile essentielle est généralement élevé, il diminue lorsque la distillation est trop rapide, ou trop lente. Il s'agit d'une indication numérique qui sert à exprimer le rapport entre la vitesse de la lumière dans le vide et la vitesse de la lumière dans le milieu de propagation. Le produit étalon de qualité pour la réfractométrie accompagné de son indice de réfraction à 20°C est l'eau distillée (1,333) (AFNOR, 2000)

Dans notre travail, l'indice de réfraction est mesuré par réfractomètre dans lequel on introduit quelques gouttes d'eau distillée considérée comme étalon sur le prisme p'. L'appareil est réglé à 1,333. Ces gouttes sont essuyées et remplacées par quelques gouttes de l'HE puis on effectue la lecture. Les indices de réfraction obtenus à température ambiante sont ramenés à 20°C par la formule suivante (AFNOR, 2000):

$$I_{20} = I_t + 0,00045 (T - 20^\circ\text{C})$$

Tel que :

I_{20} : Indice de réfraction à 20°C.

I_t : Indice de réfraction à la température ambiante ou de mesure.

T : Température ambiante ou de mesure.

II-4-3-3- Caractéristiques chimiques**a- Détermination de l'indice d'acide**

L'indice d'acide est le nombre de milligramme d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres contenus dans un gramme d'HE, en présence de phénolphthaléine. Le test consiste à neutraliser 1g de l'huile essentielle dissoute dans l'éthanol à 95% par une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium 0,1N, en se servant de la phénolphthaléine à 1% comme indicateur coloré. L'indice d'acide est donc calculer par la formule suivante (AFNOR, 2000) :

$$I_A = 5,61 V / m$$

Tel que:

V : volume, en millilitres, de la solution d'hydroxyde de potassium ;

m : masse, en grammes, de la prise d'essai.

b- Détermination de l'indice d'ester

Comme pour l'indice d'acide, l'indice d'ester est un indicateur de la qualité de l'huile essentielle. En effet, les huiles de bonne qualité contiennent une grande quantité d'ester. Il s'agit du nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libérés dans 1g d'huile suite à l'hydrolyse des esters (AFNOR, 2000). Les esters contenus dans l'huile essentielle sont hydrolysés par chauffage, et la détermination de la masse de potasse consommée pendant la réaction se fera par le dosage en retour de l'excès d'alcali par une solution d'HCl.

II- 5- Isolement des souches bactériennes d'origine tellurique**II-5-1- Technique d'échantillonnage du sol**

Le prélèvement a été réalisé dans trois type de sols : sol d'un poulailler (Bouira), sol de culture de pomme de terre (Ain Timouchent) et un sol d'écurie (Boumerdès et Alger), selon la méthode « zigzag » décrite par **Chaussoud *et al.* (1992)** et **Fardoux *et al.* (2000)** (Figure 21). La technique consiste à prélever trois échantillons sur une surface de 1,5m² à 15 cm de profondeur pour chaque sol. Les trois échantillons ainsi obtenues sont mélangés, puis subissent un tamisage dans l'objectif d'éliminer les grosses molécules telles que les agrégats et les débris, et d'avoir un sol fin et une solution homogène.

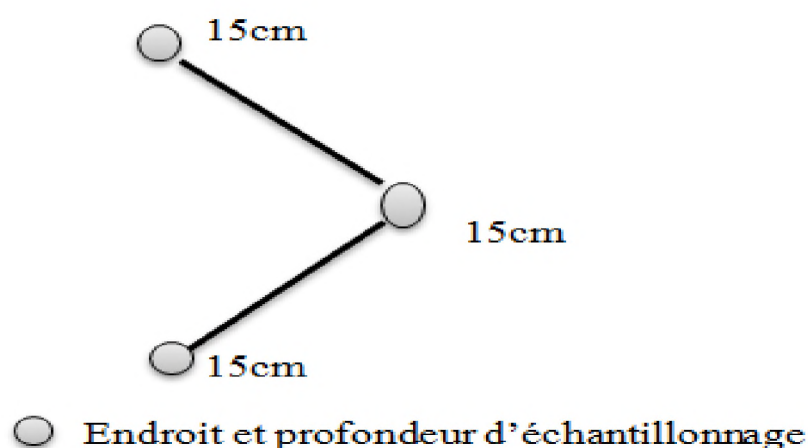


Figure 21 : méthode d'échantillonnage en « zigzag »

II-5-2- Préparation des dilutions

Les dilutions sont réalisées dans l'objectif d'obtenir le maximum de microorganismes présents dans le sol. Pour cela, 1 gramme de chaque échantillon de sol est dilué dans 9ml d'eau physiologique ce qui représente la solution mère. Les suspensions de sol sont agitées pendant 15 minutes. Après décantation, une série de dilutions est réalisée jusqu'à 10^{-6} à partir de chaque solution mère (**Bettache, 2013**). 0,1 ml de chaque dilution est ensemencé dans une gélose nutritive, et incubé à 37°C pendant 24h (**Solbi, 2013**). Les colonies bactériennes obtenues subissent un repiquage dans le but de purifier l'espèce.

II- 5-3- Identification des souches isolées

L'identification des bactéries se fait en quatre étapes :

- Examen des caractères macroscopiques de la colonie bactérienne (forme, relief, odeur, contour, taille et couleur) ;
- Examen des caractères microscopiques (coloration de Gram, forme des germes) ;
- Recherche des caractères biochimiques (Catalase, Oxydase...) ;
- Confirmation de certaines souches par VITEK.

II-5-3-1- Examen macroscopique

Cet examen nous permet d'observer à l'œil nu quelques caractères de la colonie, il s'agit de son aspect, sa couleur, sa forme, sa taille, et son relief.

II-5-3-2- Examen microscopique (coloration de Gram, forme des germes)

La coloration de Gram est utilisée dans l'objectif de différencier les bactéries en deux groupes distincts, celui des Gram positif et celui des Gram négatif.

II- 5-3-3- Recherche des caractères biochimiques

a- Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme qui décompose l'eau oxygéné en eau et en oxygène gazeux. Le principe consiste à mettre dans une lame quelques gouttes de H_2O_2 additionnées d'une colonie bactérienne. Le test de la catalase se base sur la recherche d'un dégagement de gaz (**Jacques et André, 2004**), selon la réaction suivante :



b- Recherche de l'oxydase

Pour la recherche de l'oxydase, une colonie bactérienne est déposée sur un papier filtre imbibé avec quelques gouttes de la solution N-diméthyl paraphénylène diamine. Après 30 secondes, la présence de l'oxydase est indiquée par l'apparition d'une couleur bleu violacée.

c- Galerie biochimique classique

L'identification biochimique est un examen qui permet d'identifier une bactérie en s'appuyant sur ses caractères biochimiques.

➤ Urée-Indole

Pour ce test, une suspension dense de bactéries est introduite dans 0,5 ml d'un milieu Urée-Indole, et incubé à 37°C pendant 24 à 48 h. Un virage du milieu au rouge violacé ou au rouge rose indique une réaction d'uréase positive. De plus, l'apparition d'un anneau rouge après addition de deux gouttes de réactif de Kovacs indique une réaction d'indole positif (Marchal et *al.*, 1991).

➤ VP/RM (Voges-Proskauer)

Le test consiste à ensemercer deux tubes contenant chacun 0,5 ml du milieu Clark et Lubs et les incubés à 37°C pendant 18 à 48 h. Après incubation, deux gouttes de réactif VP sont ajoutées dans l'un des deux tubes et deux gouttes de réactif RM dans l'autre. L'apparition d'un anneau rouge indique une réaction VP positive. La coloration rose fuchsia indique une réaction RM positive (Marchal et *al.*, 1991).

➤ TSI (Triple Sugar Iron)

A l'aide d'une pipette contenant des colonies prélevées, on enseme la pente puis le culot d'un tube TSI par piqûre centrale. L'incubation se fait à 37°C pendant 48 à 72h. Ce test met en évidence cinq caractères biochimiques : utilisation du lactose (coloration de la pente en jaune), utilisation du glucose (coloration du culot en jaune), utilisation du saccharose (coloration en jaune de la zone intermédiaire), la production de H₂S (noircissement de la zone joignant la pente et le culot) et la production de Gaz (présence de bulles dans la gélose) (Marchal et *al.*, 1991).

➤ **Citrate de Simmons**

Ce milieu ne contient qu'une seule source de carbone: le citrate. Seules les bactéries possédant une citrate-perméase sont capables de se développer sur ce milieu. La pente du milieu estensemencée en stries longitudinales à l'aide d'une pipette contenant une colonie et incubé à 37°C pendant 24h. La bactérie est dite Citrate-positive, si la couleur du milieu vire au bleu. Elle est cependant, qualifiée de Citrate-négative dans le cas où la couleur du milieu reste inchangée (**Marchal et al., 1991**).

➤ **Esculine**

Pour ce test, la pente du milieu estensemencée par pique centrale à l'aide d'une pipette contenant des colonies puis incubés à 37°C pendant 48 à 72h. L'hydrolyse de l'esculine (ou aesculine) qui rompt la liaison glucosidique et la libération du glucose et de l'esculitine donne une coloration noire en présence de citrate de fer ammoniacal. Un résultat positif se traduit donc par un noircissement du milieu (**Marchal et al., 1991**).

➤ **Recherche de la coagulase**

La coagulase libre est présente chez les *S. aureus*, mais elle peut également être produite par les *Staphylococcus intermedius* ou les *Staphylococcus hyicus*. Ce test consiste à mettre en évidence la coagulase libérée dans le milieu extérieur (**Garnier et Denis, 2007**).

La détection de cette coagulase s'effectue en ajoutant dans un tube à hémolyse 0,5 ml de plasma de lapin et 0,5 ml d'une culture de staphylocoques de 24h en bouillon. Le mélange est placé à l'étuve à 37°C pendant 24 heures. Les souches de *Staphylococcus aureus* provoquent la coagulation du plasma, le plus souvent après les trois premières heures. Un test positif se traduit par la formation d'un coagulum.

II- 5-3-4- Identification par VITEK

a- Préparation de la cassette

Pour l'identification par VITEK, des colonies isolées sont prélevées et mis en suspension homogène dans 3 ml de solution saline (0,45%), puis cette suspension bactérienne est standardisée selon les méthodes appropriées en utilisant le DensiChek Plus (Inoculum de 0.5 à 0.63 Mac Farland).

Pour l'antibiogramme, des colonies sont transférées dans un second tube contenant 3 ml de solution saline (145µl pour les bactéries Gram négatif et 280 µl pour les bactéries Gram

positif) puis les cartes sont placées sur la cassette en plongeant leurs pailles de transfert dans les tubes.

b- Méthodes de travail

Les conditions de culture et d'incubation des souches destinées à l'identification et/ou à l'antibiogramme sur le Vitek 2 Compact sont représentées dans le tableau suivant :

Tableau 1 : Condition de culture et d'incubation des bactéries isolées

Cartes VITEK	Milieux de culture validés	Age de la culture	Conditions d'incubation
Bacilles Gram négatif	-Gélose Tryptic Soja	18-24 h	35-37° C
	-Gélose Columbia au sang		Aérobiose
	-Gélose Mac Conkey		
	-Chrom ID CPS (chromo)		
Cocci Gram positif	-Gélose Tryptic Soja	12 à 48 h	35 – 37° C
	-Gélose Columbia au sang		Aérobiose
	-Gélose Mac Conkey		Strepto: 5 à 10% CO ₂
	-Chrom ID CPS (chromo)		Microcoques: pas de CO ₂

Après avoir préparé l'inoculum, la carte d'identification est placée sur la cassette en plongeant la paille de transfert dans le tube contenant la solution mère. Pour l'antibiogramme la carte d'antibiogramme est placée sur la cassette en plongeant la paille de transfert dans l'autre tube contenant la suspension mère diluée.

II- 6- Evaluation de l'activité antibactérienne

La technique utilisée pour évaluer l'activité antibactérienne des extraits (flavonoïdes et huiles essentielles) est la méthode de diffusion en disque sur milieu gélosé, selon le Comité National des Normes du Laboratoire Clinique (NCCLS, 2001). Cette méthode permet de déterminer l'activité inhibitrice de l'agent antibactérien, par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour du disque imprégné de l'extrait à tester.

II-6-1- Revivification et repiquage des souches bactériennes

La revivification des souches bactériennes est une étape nécessaire avant leur utilisation car leur activité est nulle à l'état conservé. Elle a pour objectif l'obtention d'une culture jeune

et pure et des colonies bien isolées qui vont servir à préparer l'inoculum. Pour cela, les souches sont ensemencées par des stries dans des boîtes de Pétri et incubées à 37°C pendant 24 heures.

Les souches bactériennes obtenues sont repiquées dans des boîtes de Pétri renfermant le milieu Muller-Hinton par la méthode des stries, puis incubées à l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

II-6-2- Préparation de l'inoculum

L'inoculum est préparé à partir de colonies jeunes de bactérie dans de l'eau physiologique stérile (0,9%). Les colonies sont prélevées à l'aide d'une anse de platine et homogénéisées dans de l'eau physiologique. Il faut noter que pour l'obtention de la suspension 10^8 UFC par ml, l'absorbance à 620nm doit être comprise entre 0,2 et 0,3.

II-6-3- Préparation des disques

Des disques stériles de papier Whatman de 9 mm de diamètre, sont chargés avec l'extrait à tester à raison de 10 µl par disque, des disques d'antibiotiques spécifiques pour chaque bactérie sont aussi utilisés.

II-6-4- Ensemencement

Des boîtes de Pétri préalablement préparées, ont été ensemencées par la suspension bactérienne. À l'aide d'une pince stérile, les disques (5 par boîte) contenant les produits à tester sont déposés à la surface de la gélose inoculée au préalable et le tout est incubés à 37°C pendant 24h.

II-6-5- Expression des résultats

Après l'achèvement de la période d'incubation, la lecture du diamètre de la zone d'inhibition se fait comme suit (**Moreira et al., 2005**):

- Non sensible (**R**) pour un diamètre de 10mm.
- Sensible (**S**) pour un diamètre entre 10 et 14mm.
- Très sensible pour un diamètre entre 15 et 19mm.
- Extrêmement sensible pour un diamètre plus de 20 mm.

II-6-6-Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) pour l'extrait flavonoïque

La CMI d'un extrait vis-à-vis d'une souche bactérienne donnée est par définition la plus faible concentration à laquelle le microorganisme ne démontre aucune croissance visible. Sa détermination a été effectuée selon le Comité National des Normes du Laboratoire Clinique (NCCLS, 2001) en utilisant la méthode de micro-dilution en bouillon (milieu Mueller Hinton). Pour se faire, une gamme de dilution est préparée (1/2, 1/4, 1/8 et 1/16) dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) à 1% et distribuée dans une microplaque de 96 puits. L'inoculum bactérien déjà préparé (10^8 UFC/ ml) est ajouté dans chaque puits à raison d'un volume de 5 μ l. 70 μ l du milieu Muller Hinton en bouillon sont répartis dans les 96 puits de la microplaque. Cette dernière est ensuite incubée à 37 °C pendant 24 heures. Après incubation, la croissance bactérienne est manifestée par la présence d'un trouble au fond de la cupule. La CMI correspond donc à la concentration de l'extrait pour laquelle on n'observe pas de croissance visible à l'œil nu.

II-7- Analyse statistique

Les résultats obtenus sont exprimés sous forme de moyenne $\pm$ Erreur Standard à la Moyenne (M $\pm$ ESM). L'analyse statistique est effectuée en utilisant le logiciel Statistica (version 6, Genistat Conseils Inc, Montréal). Après analyse de la variance, la comparaison des moyennes est effectuée par le test t de student pour des échantillons appariés. Le test est considéré statistiquement significatif lorsque la valeur de p est inférieure à 0,05.

CHAPITRE III

RESULTATS ET DISCUSSION

III-1- Screening phytochimique

Les résultats des tests phytochimiques réalisés sur la poudre végétale de la plante *Euphorbia guyoniana* sont présentés dans le tableau 2. Il est important de signaler que l'abondance des métabolites a été évaluée à l'échelle visuelle.

Tableau 2 : résultats des tests phytochimiques

Composants	Abondance
Anthocyanes	-
Leuco-anthocyanes	-
Tannins totaux	+
Tannins catéchiques	-
Tanins galliques	-
Quinones libres	-
Saponosides	++
Alcaloïdes	++
Coumarines	+
Amidon	-
Flavonoïdes	+
Mucilages	+
Irridoïdes	-
Protéines	-
Lipoïdes	++
Sucres réducteurs	++
Glucosides	++
Caroténoïdes	-
Polyphénols	+

(++) : Forte teneur; (+) : Moyenne teneur ; (-) : Absence de la substance recherchée

A travers les résultats obtenus, la plante *Euphorbia guyoniana* s'est montrée riche en saponosides, alcaloïdes, lipoïdes, glucosides, et sucres réducteurs. Elle est moyennement riche en tannins totaux, coumarines, flavonoïdes, mucilages, et en polyphénols. Les autres composants tels que les anthocyanes, les leuco-anthocyanes, les tannins catéchiques, les

tanins galliques, les quinones libres, l'amidon, les irridoides, les protéines, et les caroténoïdes sont totalement absents.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par plusieurs auteurs, mentionnant la biosynthèse de divers composés chimiques par les plantes appartenant à la famille des *Euphorbiaceae*, tels que les flavonoïdes responsables des activités anti-malariques (**Liu et al., 2007**) et anti inflammatoires (**Ekpo et Pretorius, 2007**), les alcaloïdes à propriétés anti-microbiennes (**Dias et al., 2007**) et anti-tumorales (**Suarez et al., 2004**), les saponosides porteurs d'activités cytotoxiques (**Kiem et al., 2009**) et anti-ulcéreuses (**Ukwe, 1997**), les tanins avec des propriétés anti-virales (**Bessong et al., 2006 ; Liu et al., 1999**), antimutagéniques (**Rossi et al., 2003**) et anti-fongiques (**Hwang et al., 2001**), les polyphénols aux propriétés anti-tumorales (**Yu et al., 2005**) et anti-oxydantes (**Yang et al., 2007**) et enfin les coumarines (**Aynehchi et al., 1978**).

Une étude phytochimique réalisée par **Haba (2007)** sur l'espèce *Euphorbia guyoniana* a permis l'isolement de 39 métabolites secondaires dont 37 composés de nature diterpénique et triterpénique, par différentes méthodes chromatographiques (Chromatographie sur Couche Mince, Chromatographie en Phase Gazeuse et Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance). Ce même auteur a caractérisé dans les racines de cette plante deux nouveaux composés: un triterpène tétracyclique à squelette cycloartane et un diterpène polycyclique à squelette tiglane, dérivé des esters de phorbol, connus pour leur cytotoxicité et propriétés co-cancérogènes prometteuses.

Par ailleurs, **Boudiar et al. (2010)** ont pu isoler des parties aériennes d'*Euphorbia guyoniana* un nouvel alcaloïde, 1,5-diphényl-3-styryl-2-pyrazoline, en plus de six flavonoïdes déjà connus : kaempférol, kaempférol 3-O-glucoside, kaempférol 3-rutinoside, quercétine, quercétine 3-O-glucoside et la rutine. La composition d'*Euphorbia guyoniana* en métabolites primaires et secondaires n'est que le résultat d'adaptation évolutive liée étroitement aux conditions biotiques (l'espèce elle-même) et abiotique (milieu). D'après **Fadili et al. (2015)**, les facteurs climatiques (température élevée, exposition solaire, sécheresse, salinité) stimulent la biosynthèse des métabolites secondaires, et par conséquent influencent la composition chimique tout au long du développement de la plante.

III-2- Rendement et caractérisation des flavonoïdes

L'extraction des flavonoïdes de la plante *Euphorbia guyoniana* a été effectuée par des solvants à polarité croissante (Méthanol, Ether di éthylique, Acétate d'éthyle et Butanol), et à ainsi permis d'obtenir quatre extraits : Extrait d'Ether di éthylique (EDE), Extrait d'Acétate d'Ethyle (EAE), Extrait Butanolique (EB) et Extrait Aqueux (EA).

III-2-1- Rendement en flavonoïdes

Les résultats du rendement des quatre extraits de la plante *Euphorbia guyoniana*, obtenus à partir de 30g de poudre végétale, sont représentés dans le tableau 3 et la figure 23.

Tableau 3: couleur, aspect et rendements massiques de l'extraction

Phase	Couleur et aspect	Masse du ballon vide (g)	Masse du ballon avec l'extrait (g)	Rendement (%)
Ether di éthylique	Vert foncé (liquide)	189,89	191,88	6,66 %
Acétate d'éthyle	Vert clair (liquide)	189,89	191,06	3,9 %
Butanolique	Marron (liquide)	189,89	190,47	1,96 %
Aqueuse	Marron foncé (caramélisé)	189,89	190,40	1,7 %

Le tableau ci-dessus montre que les extraits flavonoïques présentent un aspect liquide ou aqueux et une couleur allant du jaune au marron. Le rendement en flavonoïdes varie de 1,7% (EA) à 6,66% (EDE). Le rendement en extrait aqueux obtenu lors de cette étude est supérieur à celui obtenu par macération à l'acétone par **Kemassi (2015)** de la même espèce récoltée à Ghardaïa, soit 0,082%. En revanche, **Herouini et al. (2015)** ont obtenue par reflux un rendement en extrait flavonoïque de 6,3% dans les racines et 4,3% dans les parties aériennes de la plante *Euphorbia guyoniana* récoltée de la région de Oued sebseb (Sahara algérien). Selon **Haba et al. (2007)**, *Euphorbia guyoniana* récoltée de la région de Biskra (sud-est algérien) est une plante riche en métabolites secondaires dont les diterpènes, les triterpènes, les stéroïdes et les composés aromatiques. **Smara et al. (2014)** ont révélé un rendement qui

varie de 1% pour l'extrait d'acétate d'éthyle à 2,6% pour l'extrait butanolique obtenus de la plante *Euphorbia gnyoniana* récoltée de la région de oued-Souf, Sud-est de l'Algérie.

En revanche, des résultats différents ont été révélés par **Chaabi (2007)** pour des plantes du même genre, *Euphorbia stenoclada baill* récoltée au Madagascar, soit un rendement de 13,2% pour la phase aqueuse. De même, **Soma Oubougoué Brama (2002)** a obtenu un rendement en extrait aqueux d'*Euphorbia hirta* de 3,13% . Enfin, **Descourtieux et al. (1988)** ont trouvé dans leur étude sur *Euphorbia hirta* récoltée en France un rendement en extrait aqueux proche de 14%. Le rendement en flavonoïdes semble dépendre donc de la nature du biotope et de la méthode d'extraction, sachant que le nombre de lavage réalisé dans le protocole d'extraction pourrait entraîner des pertes substantielles des aglycones, d'où les inconvénients de la méthode d'extraction par confrontation de solvants. Des travaux similaires ont rapporté l'existence d'une variabilité des valeurs de rendement en métabolites secondaires selon la procédure d'extraction (**Sagdic et Ozcan, 2003 ; Moreira et al., 2005 ; Celiktas et al., 2007 ; Turkmen et al., 2007**).

III-2-2- Dosage colorimétrique des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été effectué par la méthode de Trichlorure d'Aluminium. Leur quantification a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage réalisée par un flavonoïde standard (la Quercétine). La teneur en flavonoïdes est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme de poids de l'extrait (mg EQ/g). La courbe d'étalonnage obtenue est une droite dont l'équation est $Y=11,384x+0,1036$ avec un coefficient de corrélation R^2 de 0,9938 (Annexe 04).

Les valeurs de l'absorbance des quatre extraits à 430nm sont 0,821 pour la phase aqueuse, 0,523 pour l'extrait butanolique, 0,271 pour l'éther diethyle, et 0,246 pour l'acétate d'éthyle (Figure 22).

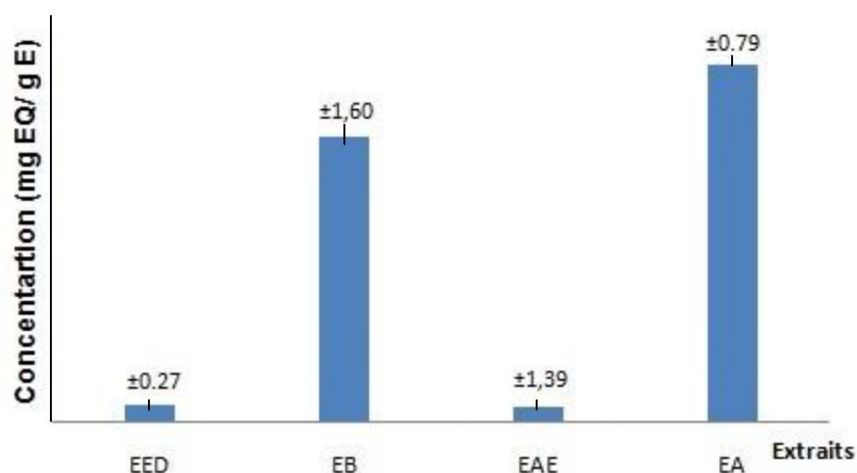


Figure 22 : concentration des fractions flavonoïques de la plante *Euphorbia guyoniana*

Nos résultats montrent que l'extrait aqueux de la plante *Euphorbia guyoniana* renferme environ 0,31 mg EQ/gE. Les concentrations des autres fractions étaient de 0,247 mg EQ/gE (EB), 0,012 mg EQ/gE (EAE) et de 0,0147 mg EQ/gE (EED). Cependant, **Andrianarisoa et Tsirinirindravo (2009)** ont trouvé une concentration d'environ 63,39 µg / µl d'extrait aqueux obtenus des feuilles de *Dalechampia clematidifolia* Baill. (*Euphorbiaceae*) récoltées au Madagascar, ce qui représente une valeur nettement inférieure à celle trouvée pour l'espèce *Euphorbia guyoniana*.

D'après **Lee et al. (2003)**, la méthode d'extraction et la région de récolte influence le rendement. La teneur phénolique d'une plante est étroitement liée à un ensemble de facteurs intrinsèques et extrinsèques, en particulier les conditions climatiques, le stade de développement de la plante, la récolte et les conditions de stockage (**Podsdek, 2007; Falleh et al., 2008**).

III-2-3- Analyse des flavonoïdes par infrarouge

Les résultats de la caractérisation par infrarouge des extraits obtenus sont représentés dans le tableau suivant et la figure (Annexe 05). L'interprétation des spectres obtenus est faite selon la base de données établie par (Mabry *et al.*, 1970).

Tableau 4: résultats de l'analyse infrarouge des fractions flavonoïdiques d'*Euphorbia guyoniana*

Fraction flavonoïque	Longueur d'onde (Cm ⁻¹)	Liaisons	Nature de la liaison	Fonction
Fraction aqueuse	3406,58	-OH libre	Bande large	Phénol
	1609,47		Bande moyenne	Aldéhyde
	1079,29	C-O	Bande étroite	Ester
Fraction d'éther di-éthylique	3441,38	-OH libre	Bande large	Phénol
	2924,40	C-H	Bande étroite	Alcène
	1071,99	C-O	Bande moyenne	Ester
Fraction d'acétate d'éthyle	3419,33	-OH libre	Bande large	Phénol
	2924,55	C-H	Bande étroite	Alcène
	1457,11	CH ₂ , CH ₃	Bande étroite	Alcane
	1207,06	C-H	Bande moyenne	Alcène
	1073,50	C-O	Bande moyenne	Ester
Fraction butanolique	3406,31	-OH libre	Bande large	Phénol
	2925,31	C-H	Bande étroite	Alcène
	1634,39	C=O	Bande moyenne	Aldéhyde
	1072,99	C-O	Bande forte	Ester

Dans l'ensemble les extraits flavonoïques d'*Euphorbia guyoniana* contiennent peu de bandes, ils sont surtout riche en liaisons -OH (de 3441, 38 cm^{-1} jusqu'à 3406,31 cm^{-1}) à fonction phénol.

En comparant les différents spectres d'analyse obtenus à partir des fractions flavonoïques d'*Euphorbia guyoniana*, on trouve presque les mêmes liaisons et les mêmes longueurs d'ondes, ceci est un indice de pureté des extraits.

Dans leur étude sur la partie aérienne de l'espèce *Euphorbia guyoniana*, Smara *et al.* (2014) ont réalisée une analyse IR sur leurs extraits acétate d'éthyle et n-Butanol. Les spectres IR montrent les groupements suivants : un hydroxyle à 3208,6 cm^{-1} , une fonction carboxyle (COOH) à 1722,7 cm^{-1} , un groupe carbonyle (C=O γ -pyrone) à 1651,9 cm^{-1} et une double liaison C=C (1604,1 cm^{-1} , 1497,8 cm^{-1}). Le spectre montre également la présence des bandes d'absorptions des liaisons C-H à (1438,3 cm^{-1}) et une fonction C-O glycoside (1079,7, 1013,3 cm^{-1}). Ces résultats ne sont pas en accord avec ceux obtenus dans notre étude sur les parties aériennes et souterraines de la même plante.

III-2-4- Analyse chromatographique de la phase aqueuse par HPLC

L'analyse chromatographique des flavonoïdes de l'extrait aqueux d'*Euphorbia guyoniana* par HPLC a révélé la présence de 41 composés flavonoïques, dont 27 ont pu être identifiés. L'identification a été effectuée par comparaison des temps de rétention du composé avec celui des standards (Tableau 5, Figure 23).

Tableau 5: HPLC de la phase aqueuse d'*Euphorbia guyoniana*

Numéro	R _T (Min)	Pourcentage	Nom de la molécule
01	34,203	0,4%	Acide p-coumarique
02	46,703	1,0%	Acide rosmarinique
03	62,753	2,0%	Quercetine
04	17,237	9,5%	Acide gallique
05	27,320	0,4%	Acide caféique
06	41,137	0,3%	Rutine
07	50,403	19,1%	Acide ellagique
08	56,103	6,6%	Myricetine
09	27,320	0,4%	Acide syringique
10	37,903	0,2%	Acide férulique
11	64,670	4,0%	Kaempférole
12	23,520	0,3%	Dimère de proanthocyanidine
13	41,137	0,3%	Myricétine 3-O-glucoside
14	61,787	1,5%	Amentoflavone
15	45,320	1,6%	Acide Isoferulique
16	47,953	2,5%	Quercetine-3-β-Ogalactoside
17	49,470	1,5%	Luteolin-7-β-Oglucoside
18	56,103	6,6%	Quercetine-3-O-α-rhamnoside
19	73,337	1,5%	Luteoline
20	10,187	4,4%	Hydroxytyrosole
21	58,370	3,0%	Apigenine-7-Oglucoside
22	54,737	4,7%	Apigenine-7-Orutinoside
23	49,470	1,5%	Luteoline-7-Oglucoside
24	23,520	0,3%	Acide salicyclique
25	43,053	0,3%	Acide benzoïque
26	47,953	2,5%	Acide M-coumarique
27	58,370	3,0%	Acide O-coumarique

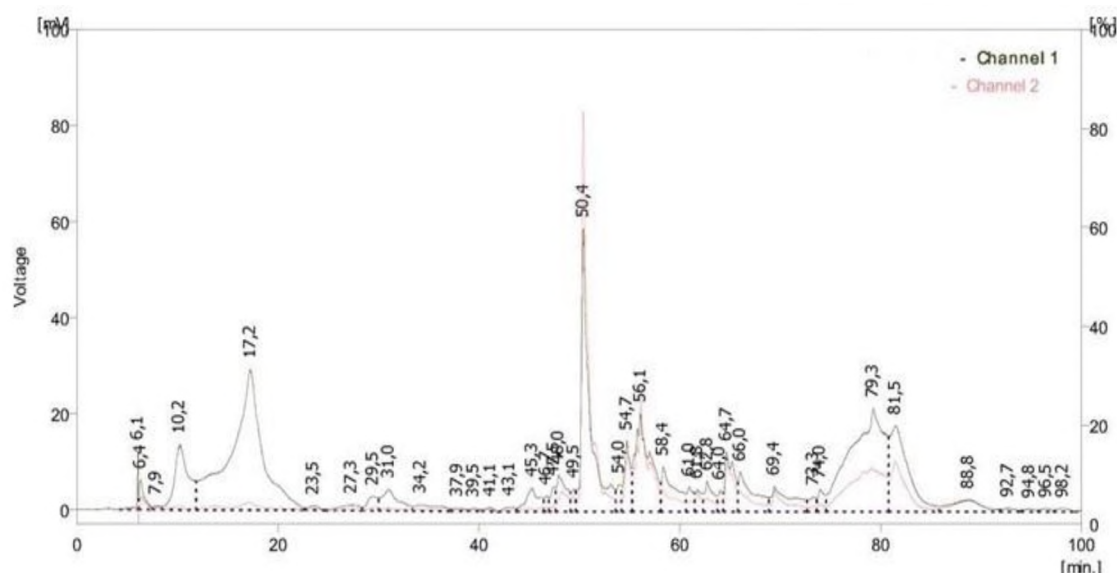


Figure 23 : chromatogramme d'HPLC et temps de rétention de la phase aqueuse des flavonoïdes d'*Euphorbia guyoniana*.

Il ressort de l'analyse que l'extrait aqueux d'*Euphorbia guyoniana* est riche en molécules dotées d'activité antibactérienne. Les composés majoritaires sont l'acide ellagique (19,1%), l'acide gallique (9,5%), la Myricetine et la Quercetine-3-O- α -rhamnoside (6,6%), l'Apigénine-7-Orutinoside (4,7%), l'Hydroxytyrosole (4,4%) et le Kaempférole (4,0%), les autres molécules identifiées sont présents à des taux inférieurs à 3%. Une étude réalisée par **Smara et al. (2014)** sur les parties aériennes de la même plante a révélé la présence d'un tanin hydrolysable, d'une coumarine unique et de deux flavonoïdes (flavonol) à savoir la quercétine-3O- β -D -glucuronide et kaempférol-3O- β -D-glucuronide. Dans notre étude, la quercétine a été détectée comme une molécule libre, et aussi associée au galactoside, au glucoside ou au rhamnoside. Quant au kaempférole, ce composé a également été identifié sous forme libre.

III-3- Rendement et caractérisation des huiles essentielles

L'huile essentielle d'*Euphorbia guyoniana* est limpide de couleur jaune clair et dégage une odeur forte caractéristique. Le rendement obtenu est très faible, soit 0,5% pour 60g de matière végétale. Pour cela, nous avons effectué plusieurs hydrodistillations, afin d'obtenir une quantité suffisante pour effectuer le test antibactérien.

Les *Euphorbiaceae* sont connus pour leur richesse en huiles essentielles (Kouamé, 2012). Cependant le rendement obtenu dans notre étude sur la plante *Euphorbia guyoniana* est très faible (0,5%). Ces résultats semblent être plus élevés que ceux obtenus par Benmeddour (2016) qui a également noté la faible teneur en huiles essentielles d'*Euphorbia guyoniana* (0,007% pour 3000g de matière végétale) obtenues également par hydrodistillation. Zellagui *et al.* (2012) n'ont trouvé aucune trace d'huile essentielle au niveau des racines et même au niveau des feuilles de la même espèce. Néanmoins, et à l'heure actuelle des innovations technologiques peuvent permettre d'isoler, de purifier et de caractériser des quantités de l'ordre de nanogramme en métabolites secondaires (Li *et al.*, 2014).

III-3-1- Caractérisation des huiles essentielles par GC-MS

Les résultats de la caractérisation des huiles essentielles de la plante *Euphorbia guyoniana* par GC-MS sont représentés par le chromatogramme suivant :

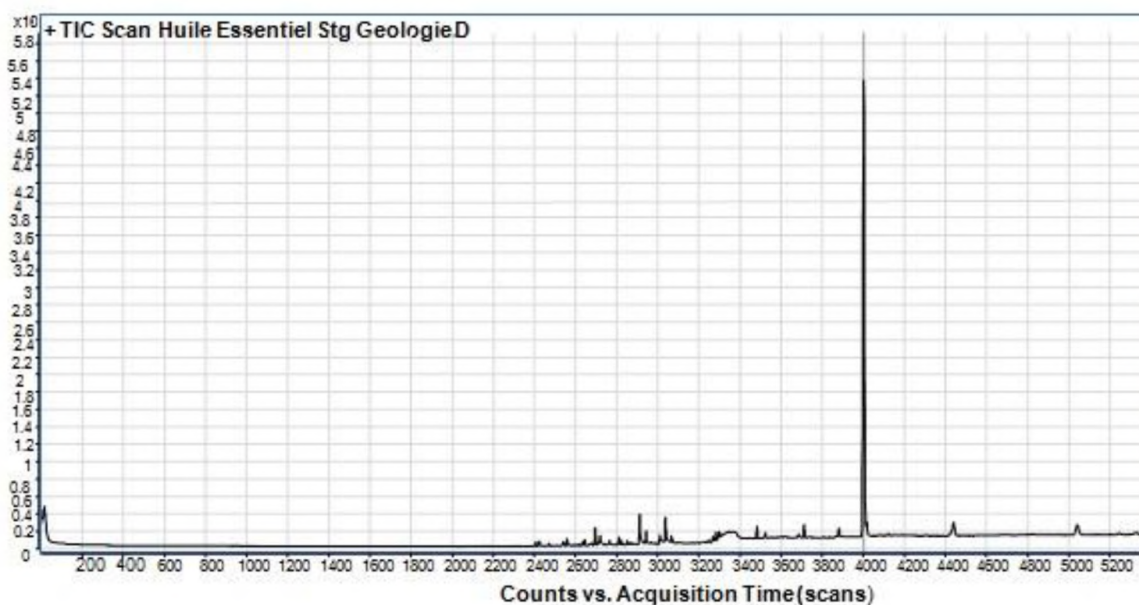


Figure 24: GC-MS des huiles essentielles de la plante *Euphorbia guyoniana*.

L'analyse par CG-MS de l'huile essentielle d'*Euphorbia guyoniana* n'a pu identifier qu'un seul composé avec un taux de 58% et un temps de rétention (R_t) de 40 min. Il s'agit du BIS (2-ethylhexyl) phthalate d'un poids moléculaire de 390 g/mol et dont la formule chimique est $C_{24}H_{38}O_4$.

Ce composé est l'un des constituants du latex polymère acrylique (Aymonier *et al.*, 2001). Les autres composés n'ont pas pu être identifiés. L'analyse des huiles essentielles de la plante *Euphorbia guyoniana* par la méthode de chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse par impact électronique (GC et GC-EIMS) a permis l'identification de plus de 91% composés volatiles. Cette analyse a montré que les huiles sont riches en apocaroténoïdes, issus du métabolisme des caroténoïdes, avec des pourcentages allant de 15,2% jusqu'à 60,1%. Les composés majeurs de ces apocaroténoïdes varient, selon le nombre de carbone, de C₁₁ (dihydroactinidiolide) à C₁₈ (hexahydro farnésyl acétone) (Benmeddour, 2016).

III- 3-2- Analyse des paramètres physico-chimiques de l'huile essentielle

Les résultats de l'analyse des paramètres physico-chimiques de la plante *Euphorbia guyoniana* sont mentionnés dans le tableau 6.

Tableau 6 : propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle d'*Euphorbia guyoniana*

Paramètres physico-chimique	Valeurs	Normes AFNOR
Densité	0,9327	0,906- 0,990
Indice de réfraction	1,498	1,495- 1,513
Indice d'ester	199.3	≤ 200
Indice d'acide	0,313	< 2

La densité trouvée dans notre étude est de 0.9327, ce qui classe cette huile dans la catégorie des huiles de bonne qualité. En effet la norme **AFNOR (2000)** préconise une densité comprise entre 0,906 pour les huiles de faible qualité et 0,990 pour les huiles de très haute qualité, en fixant une densité de 0,925 qui au-dessous de laquelle l'huile est considérée de qualité III. Avec une densité de 0,9327, nous pouvons supposer que l'huile essentielle d'*Euphorbia guyoniana* est de qualité II.

L'indice de réfraction trouvé dans cette étude est de 1,498. Ce qui pourrait classer notre huile dans la catégorie des huiles de haute qualité, selon les normes **AFNOR (2000)** qui note des valeurs d'indice de réfraction pour les huiles essentielles comprises entre 1,495 et 1,513 (1,495 pour les huiles de haute qualité et 1,513 pour les huiles de moindre qualité). Quant à l'indice d'acide, il doit être le plus petit possible, ce qui est le cas pour notre étude avec une

valeur de 0,313. En effet une huile essentielle fraîche doit contenir très peu d'acide, alors qu'une huile altérée, notamment par la lumière favorise la prolifération des acides (Fauconnier, 2006). De même, un indice d'acide inférieur à 2 est un indicateur d'une bonne conservation de l'huile. Contrairement à l'indice d'acide, plus l'indice d'ester est élevé mieux est la qualité d'une huile essentielle, la valeur de celui-ci dans notre étude est de 199,3, qui est une valeur très élevée. En effet aucune étude n'a jusqu'ici donné une valeur d'indice d'ester au-delà de 200 (AFNOR, 2000).

III-4- Identification des souches bactériennes isolées

III-4-1- Pré-identification des souches

Les résultats des examens macroscopiques, microscopiques ainsi que la recherche des caractères biochimiques, sont illustrés dans les tableaux 7 et 8.

Tableau 7 : pré identification des souches isolées

Souche	Aspect macroscopique		Aspect microscopique		Culture		Tests d'orientation	
	Forme	Taille	Etat frais	Coloration de Gram/ Mode de regroupement	Milieu de culture	Conditions	Oxydase	Catalase
01	Colonies rondes de couleur rose	1 mm	Cocci immobile	G + Grappe de raisin	Chapman	24h à 37°C	-	+
02	Colonies opaques de couleur jaunâtre	3 mm	Bacille mobile	G- Isolée	Hektoen	24h à 37°C	-	+
03	Colonies rondes de couleur transparente	1.5 mm	Cocci Immobile	G+ En chaînette	BEA	24h à 37°C	-	-
04	Colonies pigmentées bleu-vert avec odeur de jasmin	3 mm	Bacille Mobile	G- Isolée ou en amas	Mac Conkey	24h à 37°C	+	+
05	Colonies ayant la couleur du milieu avec centre noir et contour régulier	2 mm	Bacille Mobile	G- Isolée ou en amas	Hektoen	24h à 37°C	-	+
06	Colonies translucides à opaques avec surface brillante	3 mm	Bacille mobile	G- Isolée	Mac Conkey	24h à 37°C	-	+
07	Colonies rondes, lisses légèrement bombées et muqueuses à contour régulier	3mm	Bacille Mobile	G- En amas	Mac Conkey	24h à 37°C	-	+
08	Colonies de couleur grisâtre et contour régulier	1 mm	Bacille mobile	G- Isolée ou en diplobacille	Gélose nutritive et King B	24h à 30°C	+	+
09	Colonies de couleur bleuâtres à contour régulier	4 mm	Bacille mobile	G- Isolée ou en amas	Hektoen	24h à 30°C	-	+
10	Colonies pigmentées en rouge avec un aspect lisse et un contour régulier	2 mm	Bacille mobile	G- Isolée	Gélose nutritive	24h à 37°C	-	+
11	Colonies jaunâtre avec un aspect lisse et un contour régulier	4 mm	Cocci Immobile	G+ En chaînette	Gélose au sang	24h à 37°C	-	-
12	Colonies muqueuses ressemblant à des gouttes de miel	2 mm	Bacille immobile	G- Isolée ou en amas	Mac Conkey	24h à 37°C	-	+
13	Colonies de couleur blanchâtre, surélevées, circulaires lisse, brillante et opaques	3 mm	Cocci Immobile	G+ diplocoque, ou en amas	Gélose au sang	24h à 37°C	-	+
14	Envahit la gélose par ondes successives et concentriques	4 mm	Bacille Mobile	G- Isolée ou en amas	Mac Conkey	24h à 37°C	-	+
15	Colonies lisses à bordure nette	3 mm	Coccobacille immobile	G- En diplocoque	Gélose de Drigalski	24h à 33-35°C	-	+
16	Colonies bleuâtres à centre brun et aplaties	5 mm	Bacille mobile	G- Isolée ou en amas	EMB	24h à 37°C	-	+

+: Présence ; -: Absence ; G +: Gram positive; G -: Gram négative ; BEA: Bile Esculine Azide ; EMB: Eosine Bleu de Méthylène

Tableau 8: données des galeries biochimiques

Souche	Galeries biochimiques													Famille / espèce
	NR	Mob	Gaz	Glu	Sac	Lac	H ₂ S	Urée	Indol	CIT	LDC	ODC	ADH	
01	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	/	/	/	<i>Staphylococcaceae</i>
02	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	<i>Enterobacteriaceae</i>
03	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	<i>Streptococcaceae</i>
04	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	<i>Pseudomonadaceae</i>
05	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	<i>Salmonella spp.</i>
06	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	<i>Citrobacter koseri</i>
07	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	<i>Enterobacteriaceae</i>
08	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	<i>Pseudomonadaceae</i>
09	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	<i>Enterobacteriaceae</i>
10	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	<i>Enterobacteriaceae</i>
11	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	<i>Streptococcaceae</i>
12	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	<i>Enterobacteriaceae</i>
13	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	/	/	/	<i>Staphylococcaceae</i>
14	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	<i>Enterobacteriaceae</i>
15	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	<i>Moraxellaceae</i>
16	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	<i>Enterobacteriaceae</i>

+: présence ; -: absence ; / : inaccompli ; NR : nitrate réductase ; Mob : mobilité ; Glu : glucose ; Sac : saccharose ; Lac : lactose ; CIT : citrate ; LDC : lysine décarboxylase ; ODC : ornithine décarboxylase ; ADH : arginine di hydrolase

III-4-2- Identification par VITEK

L'identité des différentes souches isolées a été complétée par un système d'identification microbienne entièrement automatisé (VITEK). Les résultats obtenus sont notés sur les tableaux suivants :

Tableau 9: identification des bactéries *Enterococcus faecalis* par VITEK

Antibiotique	CMI	Interprétation	Antibiotique	CMI	Interprétation
Benzylpénicilline	2	S	Erythromycine	≥ 8	R
Ampicilline	≤ 2	S	Clindamycine	≥ 8	R
Ampicilline/Sulbactam	≤ 2	S	Quinupristine/Dalfopristine	4	R
Céfuroxime	≥ 64	R	Linézolide	2	S
Céfuroxime axétil	≥ 64	R	Téicoplanine	$\leq 0,5$	S
Imipénème	≤ 1	S	Vancomycine	1	S
Gentamicine à haute concentration	SYN-R	R	Tétracycline	≥ 16	R
Streptomycine à haute concentration	SYN-S	S	Tigecycline	$\leq 0,12$	S
Lévofloxacine	≥ 8	R	Nitrofurantoïne	≤ 16	S
Moxifloxacine	≥ 8	R	Triméthoprine/sulfaméthoxazole	40	R

Tableau 10: identification par VITEK de *Pseudomonas aeruginosa*

Antibiotique	CMI	Interprétation	Antibiotique	CMI	Interprétation
Ampicilline	≥ 32	R	Imipénème	2	S
Amoxicilline/acide clavulanique	≥ 32	R	Amikacine	≤ 2	S
Ticarcliline	64	S	Gentamicine	2	S
Pipéracilline/tazobactam	8	S	Tobramycine	≤ 1	S
Céfalotine	/	/	Acide nalixidique	≥ 32	R
Céfoxitine	≥ 64	R	Ciprofloxacine	$\leq 0,25$	S
Céfotaxime	32	R	Ofloxacine	1	S
Ceftazidime	4	S	Nitrofurantoïne	≥ 512	R
Ertapénème	/	/	Triméthoprine/sulfaméthoxazole	160	R

Tableau 11: identification par VITEK de *Citrobacter koseri*

Antibiotique	CMI	Interprétation	Antibiotique	CMI	Interprétation
Ampicilline	/	/	Imipénème	≤ 0,25	S
Amoxicilline/acide clavulanique	≤ 2	S	Amikacine	≤ 2	S
Ticarcilline	32	R	Gentamicine	≤ 1	S
Pipéracilline/tazobactam	≤ 4	R	Tobramycine	≤ 1	S
Céfaloine	≤ 2	R	Acide nalixidique	4	S
Céfoxitine	≤ 4	S	Ciprofloxacine	≤ 0,25	S
Céfotaxime	≤ 1	S	Ofloxacine	≤ 0,25	S
Ceftazidime	≤ 1	S	Nitrofurantoine	≤ 16	S
Ertapénème	≤ 0,5	S	Triméthoprim/sulfaméthoxazole	≤ 20	S

Tableau 12: identification par VITEK de *Streptococcus agalactiae*

Antibiotique	CMI	Interprétation	Antibiotique	CMI	Interprétation
Benzylpénicilline	≤ 0,12	S	Erythromycine	/	/
Ampicilline	≤ 0,25	S	Clindamycine	≤ 0,25	R
Ampicilline/Sulbactam	≤ 2	S	Quinupristine/Dalfopristine	≤ 0,25	S
Céfuroxime	≤ 1	S	Linézolide	2	S
Céfuroxime axétil	≤ 1	S	Téicoplanine	≤ 0,5	S
Imipénème	≤ 1	S	Vancomycine	≤ 0,5	S
Gentamicine à haute concentration	/	/	Tétracycline	≥ 16	R
Streptomycine à haute concentration	/	/	Tigecycline	≤ 0,12	S
Lévofloxacine	1	S	Nitrofurantoine	≤ 16	S
Moxifloxacine	≤ 0,25	S	Triméthoprim/sulfaméthoxazole	≤ 10	S

Tableau 13: identification par VITEK de *Staphylococcus aureus*

Antibiotique	CMI	Interprétation	Antibiotique	CMI	Interprétation
Test cefoxitine screen	POS	+	Pristinamycine	$\leq 0,5$	S
Benzylpénicilline	$\geq 0,5$	R	Linézolide	2	S
Oxacilline	≥ 4	R	Téicoplanine	$\leq 0,5$	S
Gentamicine	$\leq 0,5$	S	Vancomycine	1	S
Kanamycine	≥ 64	R	Tétracycline	≥ 16	R
Tobramycine	≤ 1	S	Fosfomycine	≤ 8	S
Ofloxacin	1	S	Nitrofurantoine	≤ 16	S
Résistance inductible à la clindamycine	NEG	-	Acide fusidique	8	I
Erythromycine	1	I	Rifampicine	$\leq 0,03$	S
Lincomycine	≤ 1	S	Triméthoprim/sulfaméthoxazole	≤ 10	S

Tableau 14: identification par VITEK de *Serratia marcescens*

Antibiotique	CMI	Interprétation	Antibiotique	CMI	Interprétation
Ampicilline	/	/	Imipénème	/	/
Amoxicilline/acide clavulanique	≥ 32	R	Amikacine	≤ 2	S
Ticarcilline	≤ 8	S	Gentamicine	≤ 1	S
Pipéracilline/tazobactam	/	/	Tobramycine	≤ 1	S
Céfaloine	≥ 64	R	Acide nalidixique	≤ 2	S
Céfoxitine	8	R	Ciprofloxacine	$\leq 0,25$	S
Céfotaxime	≤ 1	S	Ofloxacin	0,5	S
Ceftazidime	≤ 1	S	Nitrofurantoine	256	R
Ertapénème	$\leq 0,5$	S	Triméthoprim/sulfaméthoxazole	≤ 20	S

Tableau 15: identification par VITEK de *Morganella morganii*

Antibiotique	CMI	Interprétation	Antibiotique	CMI	Interprétation
Ampicilline	≥ 32	R	Imipénème	1	S
Amoxicilline/acide clavulanique	≥ 32	R	Amikacine	≤ 2	S
Ticarcilline	≤ 8	S	Gentamicine	≤ 1	S
Pipéracilline/tazobactam	≤ 4	S	Tobramycine	≤ 1	S
Céfalotine	≥ 64	R	Acide nalixidique	8	S
Céfoxitine	32	R	Ciprofloxacine	$\leq 0,25$	S
Céfotaxime	≤ 1	S	Ofloxacine	0,5	S
Ceftazidime	≤ 1	S	Nitrofurantoine	64	R
Ertapénème	$\leq 0,5$	S	Triméthoprim/sulfaméthoxazole	≤ 20	S

Tableau 16: identification par VITEK d'*Enterobacter cloacae*

Antibiotique	CMI	Interprétation	Antibiotique	CMI	Interprétation
Ampicilline	/	/	Imipénème	1	S
Amoxicilline/acide clavulanique	8	R	Amikacine	≤ 2	S
Ticarcilline	≤ 8	S	Gentamicine	≤ 1	S
Pipéracilline/tazobactam			Tobramycine	≤ 1	S
Céfalotine	≥ 64	R	Acide nalixidique	4	S
Céfoxitine	≥ 64	R	Ciprofloxacine	$\leq 0,25$	S
Céfotaxime	≤ 1	S	Ofloxacine	$\leq 0,25$	S
Ceftazidime	≤ 1	S	Nitrofurantoine	≤ 16	S
Ertapénème	$\leq 0,5$	S	Triméthoprim/sulfaméthoxazole	≤ 20	S

Tableau 17: identification par VITEK de *Klebsiella pneumoniae*

Antibiotique	CMI	Interprétation	Antibiotique	CMI	Interprétation
Ampicilline	16	R	Imipénème	$\leq 0,25$	S
Amoxicilline/acide clavulanique	≤ 2	S	Amikacine	≤ 2	S
Ticarcilline	≥ 128	R	Gentamicine	≤ 1	S
Pipéracilline/tazobactam	≤ 4	S	Tobramycine	≤ 1	S
Céfalotine	≤ 2	S	Acide nalixidique	4	S
Céfoxitine	≤ 4	S	Ciprofloxacine	$\leq 0,25$	S
Céfotaxime	≤ 1	S	Ofloxacine	$\leq 0,25$	S
Ceftazidime	≤ 1	S	Nitrofurantoine	64	I
Ertapénème	$\leq 0,5$	S	Triméthoprine/sulfaméthoxazole	≤ 20	S

Tableau 18: identification par VITEK de *Staphylococcus saprophyticus*

Antibiotique	CMI	Interprétation	Antibiotique	CMI	Interprétation
Test cefoxitine screen	NEG	-	Pristinamycine	2	I
Benzylpénicilline	0,12	R	Linézolide	4	S
Oxacilline	1	S	Téicoplanine	2	S
Gentamicine	$\leq 0,5$	S	Vancomycine	$\leq 0,5$	S
Kanamycine	≤ 4	S	Tétracycline	≤ 1	S
Tobramycine	≤ 1	S	Fosfomycine	≥ 128	R
Ofloxacine	1	S	Nitrofurantoine	≤ 16	S
Résistance inducible à la clindamycine	NEG	-	Acide fusidique	8	R
Erythromycine	1	I	Rifampicine	$\leq 0,03$	S
Lincomycine	≤ 1	S	Triméthoprine/sulfaméthoxazole	≤ 10	S

Tableau 19: identification par VITEK de *Proteus mirabilis*

Antibiotique	CMI	Interprétation	Antibiotique	CMI	Interprétation
Ampicilline	≤ 32	R	Imipénème	8	I
Amoxicilline/acide clavulanique	16	I	Amikacine	≤ 2	S
Ticarcilline	≤ 128	R	Gentamicine	≤ 1	S
Pipéracilline/tazobactam	≤ 4	S	Tobramycine	≤ 1	S
Céfalotine	16	I	Acide nalixidique	4	S
Céfoxitine	≤ 4	S	Ciprofloxacine	$\leq 0,25$	S
Céfotaxime	≤ 1	S	Ofloxacine	$\leq 0,25$	S
Ceftazidime	≤ 1	S	Nitrofurantoine	128	R
Ertapénème	$\leq 0,5$	S	Triméthoprine/sulfaméthoxazole	≤ 20	S

Tableau 20: identification par VITEK de *Salmonella spp.*

Antibiotique	CMI	Interprétation	Antibiotique	CMI	Interprétation
Ampicilline	≥ 32	R	Imipénème	$\leq 0,25$	S
Amoxicilline/acide clavulanique	≥ 32	R	Amikacine	4	R
Ticarcilline	≥ 128	R	Gentamicine	≥ 16	R
Pipéracilline/tazobactam	32	I	Tobramycine	4	R
Céfalotine	≥ 64	R	Acide nalixidique	≥ 32	R
Céfoxitine	≤ 4	R	Ciprofloxacine	≥ 4	R
Céfotaxime	≤ 1	S	Ofloxacine	≥ 8	R
Ceftazidime	≤ 1	S	Nitrofurantoine	32	S
Ertapénème	$\leq 0,5$	S	Triméthoprine/sulfaméthoxazole	≤ 20	S

Tableau 21 : identification par VITEK d'*Acinetobacter baumannii*

Antibiotique	CMI	Interprétation	Antibiotique	CMI	Interprétation
Ampicilline	16	R	Imipénème	≤ 0,25	S
Amoxicilline/acide clavulanique	4	R	Amikacine	/	/
Ticarcilline	≤ 8	S	Gentamicine	≤ 1	S
Pipéracilline/tazobactam	≤ 4	S	Tobramycine	≤ 1	S
Céfalotine	/	/	Acide nalixidique	≤ 2	S
Céfoxitine	≥ 64	R	Ciprofloxacine	≤ 0,25	S
Céfotaxime	8	S	Ofloxacine	≤ 0,25	S
Ceftazidime	4	S	Nitrofurantoine	≥ 512	R
Ertapénème	/	/	Triméthoprine/sulfaméthoxazole	≤ 20	S

Tableau 22 : identification par VITEK d'*Enterobacter aerogenes*

Antibiotique	CMI	Interprétation	Antibiotique	CMI	Interprétation
Ampicilline	/	/	Imipénème	0,5	S
Amoxicilline/acide clavulanique	≥ 32	R	Amikacine	4	S
Ticarcilline	16	S	Gentamicine	≤ 1	S
Pipéracilline/tazobactam	≤ 4	S	Tobramycine	2	S
Céfalotine	≥ 64	R	Acide nalixidique	4	S
Céfoxitine	8	R	Ciprofloxacine	≤ 0,25	S
Céfotaxime	≤ 1	S	Ofloxacine	0,5	S
Ceftazidime	≤ 1	S	Nitrofurantoine	128	R
Ertapénème	≤ 0.5	S	Triméthoprine/sulfaméthoxazole	≤ 20	S

Tableau 23 : identification par VITEK de *Pseudomonas fluorescens*

Antibiotique	CMI	Interprétation	Antibiotique	CMI	Interprétation
Ampicilline	≥ 32	R	Imipénème	2	S
Amoxicilline/acide clavulanique	≥ 32	R	Amikacine	≤ 2	S
Ticarcilline	64	S	Gentamicine	2	S
Pipéracilline/tazobactam	8	S	Tobramycine	≤ 1	S
Céfalotine	/	/	Acide nalixidique	≥ 32	R
Céfoxitine	≥ 64	R	Ciprofloxacine	$\leq 0,25$	S
Céfotaxime	32	R	Ofloxacine	1	S
Ceftazidime	4	S	Nitrofurantoine	≥ 512	R
Ertapénème	/	/	Triméthoprine/sulfaméthoxazole	160	R

Tableau 24 : identification par VITEK d'*Escherichia coli*

Antibiotique	CMI	Interprétation	Antibiotique	CMI	Interprétation
Ampicilline	≥ 32	R	Imipénème	$\leq 0,25$	S
Amoxicilline/acide clavulanique	16	R	Amikacine	4	S
Ticarcilline	≥ 128	R	Gentamicine	≥ 16	S
Pipéracilline/tazobactam	8	S	Tobramycine	≥ 16	S
Céfalotine	≥ 64	R	Acide nalixidique	≥ 32	S
Céfoxitine	≤ 4	S	Ciprofloxacine	≥ 4	S
Céfotaxime	≥ 64	R	Ofloxacine	≥ 8	S
Ceftazidime	16	R	Nitrofurantoine	≤ 16	R
Ertapénème	≤ 0.5	S	Triméthoprine/sulfaméthoxazole	≥ 320	S

Les techniques appliquées ci-dessus, notamment le VITEK, connu par sa fiabilité et sa rapidité, nous ont permis d'identifier 16 espèces bactériennes: *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter koseri*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella spp*, *Serratia marcescens*,

Staphylococcus aureus, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus agalactiae*. Cinq souches de chaque espèce ont pu être conservées sauf pour *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* où quatre souches seulement ont été conservées.

Il est important de noter que la plupart de ces bactéries ont été isolées d'un poulailler et d'une écurie. Il est à signaler aussi, que les bactéries *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas fluorescens* ont été aussi trouvées dans le sol de culture de pomme de terre.

Ces bactéries ont toutes été déjà trouvées par d'autres auteurs dans le sol. En effet, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp* et *Klebsiella pneumoniae* sont des bactéries indicatrices d'une contamination fécale (Jin *et al.*, 2004). Des études menées par Rahme *et al.* (1995) ont démontré que les espèces *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas fluorescens* trouvées dans le sol peuvent induire chez l'arabette des dames (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh) et la laitue (*Lactuca sativa* var. capitata) des symptômes de pourriture molle (soft rot). Elles sont aussi considérées comme des agents pathogènes puissants chez certains animaux, tel que le *Caenorhabditis elegans* (nématode) (Mahajan-Miklos *et al.*, 1999 ; Martinez *et al.*, 2004).

Au Canada, *Citrobacter Koseri* a été isolée à partir d'un sol de culture de persil contaminé par du purin de porc : 8 infections des voies urinaires et 1 décès ont alors été observés (Tschape *et al.*, 1995). Par ailleurs, *Streptococcus agalactiae* et *Staphylococcus aureus* sont considérées comme des bactéries environnementales vivant et se multipliant dans l'environnement de certains animaux, en particulier les bovins. Elles peuvent alors se multiplier dans le fumier, le sol, la litière, les plantes, et l'eau, provoquant ainsi des mammites cliniques (Richard *et al.*, 2006). Quant aux espèces du genre *Serratia*, Vaaje-Kolstad *et al.* (2010) ont signalé l'isolement de *Serratia marcescens* des plantes (légumes, champignons, mousses), du tube digestif des rongeurs, des insectes, de l'eau et du sol.

La bactérie *Morganella morganii* est également très répandue dans l'environnement, notamment les sols et les eaux d'égout, où elle contribue à la dégradation de la matière organique grâce à son activité protéolytique (O'Hara, 2000).

De même, les bactéries du genre *Enterobacter* tel que *Enterobacter cloacae* et *Enterobacter aerogenes* se rencontrent souvent dans le sol et dans l'eau, mais aussi dans l'intestin humain et animal (Hart, 2006).

Reuther et Noble (1993) ont isolé près de 10 000 souches de staphylocoques résistants à la novobiocine à partir de pieds des gens qui marchent pieds nus sur le sol. Les souches en

grande quantité ($>10^5$ UFC/cm²) étaient surtout *Staphylococcus cohnii* (dominant chez les hommes) et *Staphylococcus saprophyticus* (dominant chez les femmes de 10 à 29 ans). Enfin, les bactéries du genre *Proteus* tel que *Proteus mirabilis* et du genre *Acinobacter* tel que *Acinetobacter baumannii* sont ubiquistes dans l'environnement, notamment dans le sol, l'eau et/ou les eaux usées (Coker *et al.*, 2000 ; Kim *et al.*, 2003 ; Yeom *et al.*, 2013).

III- 5- Evaluation de l'activité antibactérienne

La détermination du pouvoir antibactérien de l'extrait aqueux flavonoidique et de l'huile essentielle d'*Euphorbia guyoniana*, évaluée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition, est illustrée dans le tableau 25 et les figures 31 et 32.

Tableau 25: diamètres d'inhibition des extraits d'*Euphorbia guyoniana*

Souche	Diamètre d'inhibition (mm)	
	Extrait aqueux flavonoidique	Huile essentielle
<i>Enterococcus faecalis</i>		
1	28±1,2	16±0,2
2	22±2	13±0,2
3	28±1	17±0
4	26±1,5	12±0,1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
1	28±1	13±0
2	20±1	12±0
3	12±0,2	13±0
4	18±0,2	06±1
5	19±0,2	02±1
<i>Citrobacter koseri</i>		
1	28±1,2	18±0
2	26±0,5	20±0,9
3	27±0,6	20±1
4	23±0,9	19±0,9
5	29±1	12±0
<i>Streptococcus agalactiae</i>		
1	17±1	12±0
2	18±1,2	19±0
3	15±1,5	12±0
4	12±2	13±0,1
5	10±0,9	17±0,2

<i>Staphylococcus aureus</i>		
1	21±1	22±0
2	28±0,5	20±0
3	27±1	17±0,2
4	32±1,5	18±0
<i>Serratia marcescens</i>		
1	18±0,9	20±0,1
2	12±0,3	22±0,1
3	22±1	23±0,2
4	26±1,2	17±1
5	28±0	15±0,9
<i>Morganella morganii</i>		
1	19±1,2	12±0
2	19±1,5	11±0
3	23±1	17±0,1
4	25±1	16±0,1
5	20±1	19±1
<i>Enterobacter cloacae</i>		
1	18±1	20±0
2	18±1,2	13±0
3	17±0,3	15±0
4	16±1	19±0
5	13±1	21±0,9
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
1	13±1,2	23±1
2	19±1	18±0,9
3	23±1	19±0,8
4	27±1,5	19±0
5	24±0,9	14±0
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>		
1	22±0,2	18±0
2	29±1	14±0
3	28±1	19±0
4	23±1,5	13±0
5	20±1,4	12±0
<i>Proteus mirabilis</i>		
1	20±1	14±0
2	21±0	15±0
3	17±0,1	17±0

4	12±1,5	15±0
5	11±2	18±0
<i>Salmonella spp</i>		
1	18±1	10±1
2	17±1,2	05±0,6
3	06±1,5	05±0,1
4	05±0,5	03±0,2
5	03±0,8	11±0,9
<i>Acinetobacter baumannii</i>		
1	22±1	19±0
2	23±1	18±0
3	25±1,8	14±0,4
4	18±0,4	13±0,2
5	19±0,2	20±0,1
<i>Enterobacter aerogenes</i>		
1	15±0,1	10±0
2	12±1,1	11±0,1
3	23±0,6	13±0,1
4	23±0	13±0,1
5	25±0,1	15±0
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		
1	12±0,2	22±0
2	10±0,1	21±0
3	09±0,2	17±0
4	19±0,1	16±0,9
5	13±0,4	11±0,7
<i>Escherichia coli</i>		
1	28±1,5	25±0
2	19±1	27±0
3	20±1	20±0
4	18±1,5	28±0

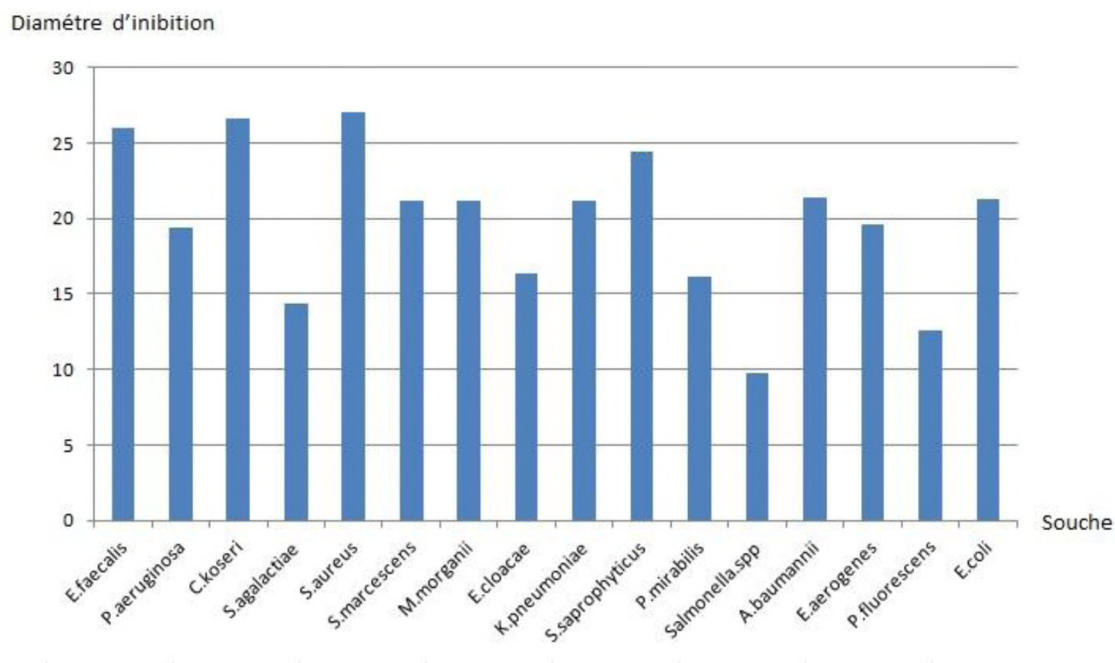


Figure 25 : sensibilité des souches bactériennes à l'extrait aqueux flavonoïdique d'*Euphorbia guyoniana*

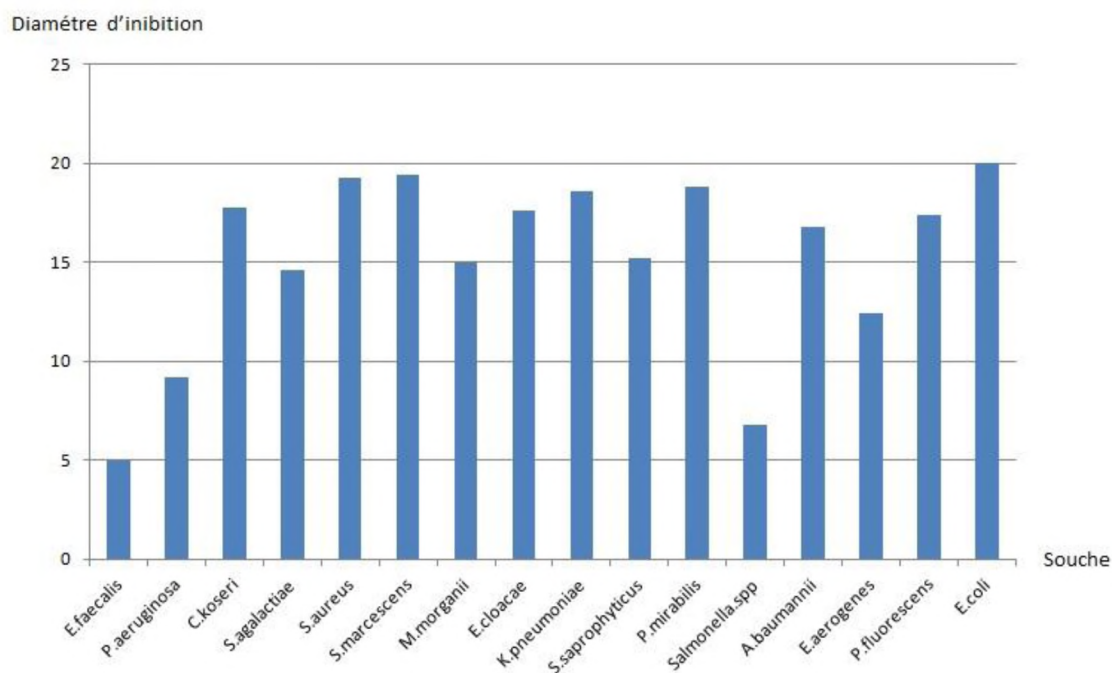


Figure 26 : sensibilité des souches bactériennes aux huiles essentielles d'*Euphorbia guyoniana*

Le tableau ci-dessus montre que certaines souches bactériennes sont extrêmement sensibles à l'extrait aqueux flavonoidique d'*Euphorbia guyoniana* avec un diamètre d'inhibition maximale de 32 mm notée pour la quatrième souche de *Staphylococcus aureus*. La même constatation a été soulevée pour la cinquième souche de *Staphylococcus saprophyticus* et de *Citrobacter koseri*. Le diamètre d'inhibition noté était de 29 ± 1 mm. De même, toutes les souches d'*Enterococcus faecalis*, ainsi que quelques unes de *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, et *Escherichia coli* se sont montrées également extrêmement sensible à l'extrait aqueux flavonoidique d'*Euphorbia guyoniana* avec un diamètre d'inhibition allant de 20 à 28 mm. Par ailleurs, certaines souches ont montrées soit une sensibilité modérée, soit une résistance. Les premières concernent les espèces *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas fluorescens*, avec des zones d'inhibition de 10 à 13mm. Les seconds sont observées pour certaines souches de *Pseudomonas fluorescens* et *Salmonella spp*. **Daglia (2011)** a démontré que les flavonoïdes et les tanins ont une forte activité antimicrobienne à large spectre, ainsi qu'une capacité à inhiber la formation de biofilms, une réduction de l'adhésion aux ligands de l'hôte et une neutralisation des toxines bactériennes.

En revanche les huiles essentielles s'avèrent moins efficaces que les flavonoïdes. Le diamètre de la zone d'inhibition obtenue est inférieur à 29 mm pour les quelques souches extrêmement sensibles (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens* et *Enterobacter cloacae*), et ne dépassant pas 19 mm pour les souches très sensibles (*Enterococcus faecalis*, *Citrobacter koseri*, *Staphylococcus aureus*, *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas fluorescens*, *Streptococcus agalactiae*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus saprophyticus*). Enfin, les souches bactériennes résistantes à l'huile essentielle sont celles de *Pseudomonas aeruginosa* et *Salmonella spp* avec des zones d'inhibition inférieure à 6 mm.

III-5-1- Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI)

Pour les bactéries sensibles, dont les zones d'inhibitions sont supérieures à 10 mm, des dilutions en série ont été effectuées afin de déterminer la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI). Les valeurs sont présentées dans le tableau 31. Il est important de signaler que vu le rendement très faible en huile essentielle (0,5% pour 60g de matière végétale), et vu

l'endémicité et la phénologie de la plante le test est réalisé uniquement pour l'extrait aqueux flavonoidique.

Tableau 26: valeurs des CMI de l'extrait aqueux flavonoidique d'*Euphorbia guyoniana*

Souche	CMI (mg/ml)	Souche	CMI (mg/ml)
<i>Enterococcus faecalis</i>		<i>Streptococcus agalactiae</i>	
1	23,23	1	2,1
2	25,87	2	1,2
3	19,87	3	1,5
4	17,05	4	1,2
		5	/
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
1	0,07	1	1,47
2	1,01	2	8,88
3	2,09	3	3,25
4	2,23	4	4,75
5	1,36		
<i>Citrobacter koseri</i>		<i>Serratia marcescens</i>	
1	0,09	1	1,9
2	0,13	2	1,3
3	0,23	3	0,1
4	1,51	4	0,1
5	0,25	5	0,09
<i>Morganella morganii</i>		<i>Enterobacter cloacae</i>	
1	1,2	1	1,67
2	1,9	2	1,87
3	0,25	3	1,78
4	0,23	4	1,9
5	0,45	5	2,8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	
1	1,23	1	0,22
2	1,67	2	0,28
3	0,93	3	0,12
4	0,99	4	0,15
5	0,9	5	0,99
<i>Proteus mirabilis</i>		<i>Salmonella spp</i>	
1	1,56	1	13,06
2	0,25	2	10,12
3	1,44	3	/
4	2	4	/
5	2,4	5	/
<i>Acinetobacter baumannii</i>		<i>Enterobacter aerogenes</i>	
1	0,78	1	2,1
2	1,2	2	1,1
3	2,5	3	0,14
4	0,4	4	0,12
5	2	5	0,1
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		<i>Escherichia coli</i>	
1	9,9	1	61,78
2	/	2	55,12
3	/	3	55,12
4	10,1	4	50,23
5	12,6		

La valeur la plus élevée de la CMI de l'extrait aqueux flavonoidique est retenue pour la première souche d'*Escherichia coli*, soit 61,78mg/ml. La plus faible est notée pour *Pseudomonas aeruginosa*, soit 0,07mg/ml. Cette étude a fait ressortir un effet antibactérien plus important des flavonoïdes. Cela peut s'attribuer à l'abondance des esters et des aldéhydes connus pour leurs effets antibactériens (**Chang et Chan, 2001**). Quant aux huiles essentielles riches en sesquiterpènes et en monoterpènes hydrocarbonés, elles sont connues pour avoir une faible activité antibactérienne par rapport aux molécules phénoliques (**Plésiat, 2011**). Que ce soit pour les flavonoïdes ou pour les huiles essentielles l'ampleur de l'effet antibactérien est significativement différente ($p < 0,05$) d'une souche à une autre au sein d'une même espèce.

La comparaison des diamètres d'inhibition avec les valeurs de CMIs obtenues, nous permet de constater que le diamètre de la zone d'inhibition ne reflète pas forcément l'efficacité de l'activité antibactérienne d'un composé. A titre d'exemple, une faible efficacité antibactérienne de l'extrait aqueux flavonoidique a été relevé à l'encontre d'*Escherichia coli* (CMI = 61,78 mg/ml), bien qu'il a induit une zone d'inhibition de la croissance assez importante ($28 \pm 1,5$ mm). Cette notion a été déjà décrite par **Cimanga et al. (2002)**.

Quelques études concernant l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux flavonoidique d'*Euphorbia guyoniana* ont été réalisées. **Herouni et al. (2015)** en utilisant séparément les extraits aqueux flavonoidiques des parties aériennes et souterraines d'*Euphorbia guyoniana* sur *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* isolés de diverses infections, ont noté une activité moins marquée que celle observée dans notre étude. Ces auteurs ont obtenu des zones d'inhibition comprises entre 7 et 8 mm. D'autre part, l'évaluation de l'activité antibactérienne de deux extraits d'*Euphorbia guyoniana* (le chlorure de méthylène-méthanol et le n-butanol) par la méthode de diffusion sur disque sur quelques souches bactériennes (*Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumonia*, *Enterobacter*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*) a montré une certaine sensibilité avec des zones d'inhibition variant entre 6 et 11,3 mm, ce qui est nettement plus faible que celles observées dans nos résultats (**Zellagui et al., 2012**). Une autre étude menée par **Palici et al. (2015)** sur l'effet des extraits flavonoïques d'*Euphorbia guyoniana* sur des bactéries à Gram + et Gram -, a signalée des zones d'inhibitions relativement bonnes, notamment sur les souches bactériennes suivantes : *Moraxella catarrhalis* (10,5mm) et *Staphylococcus aureus* (7mm), cependant *Bacillus subtilis* se trouve résistante à la plante.

Pour ce qui est des huiles essentielles, ces substances ont été considérées comme agents antimicrobiens efficaces. 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**), avec une activité variable selon la nature de l'huile essentielle et la virulence de la souche bactérienne (**Oussou, 2009 ; Avlessi, 2012**).

A la limite de nos connaissances, la seule étude traitant l'effet antibactérien de l'huile essentielle des parties aériennes d'*Euphorbia guyoniana* récoltée de la région de Biskra, a montré un effet inhibiteur plus accentué sur les bactéries Gram + (*Staphylococcus aureus*) avec un diamètre d'inhibition de 13,8 mm, que sur les bactéries Gram –, où aucune zone d'inhibition n'a été observé pour *Escherichia coli* (**Benmeddour, 2016**). Ceci ne semble pas être en accord avec nos résultats qui démontre une grande sensibilité de *Staphylococcus aureus* (22 mm) et d'*Escherichia coli* (28 mm). En revanche des études sur des espèces de la même famille ont montré que l'huile essentielle des feuilles de *Croton campestris* A.St.-Hil. var. *laetifolius* (Baill.) Müll.Arg. (*Euphorbiaceae*) inhibe la croissance de *Staphylococcus aureus* (**Babili et al., 2009**). Dans le même contexte, **Thiago et al. (2013)** ont montré une inhibition de la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* exposée à l'huile essentielle de *C. campestris*.

L'activité antibactérienne des composés naturels peut être induite par une lyse des membranes des bactéries. En effet, les flavonoides et les tanins peuvent engendrer selon **Rhayour (2002)** une fuite d'ions potassium au niveau de la membrane, ce qui entraîne des lésions irréversibles.

La différence des résultats de l'effet antibactérien des extraits (flavonoidique et HEs) d'*Euphorbia guyoniana* est probablement liée aux molécules bioactives qui les composent, et à leurs mécanisme d'action. En effet, **Cowan, (1999)** note que la toxicité des composés naturels est proportionnelle aux taux d'hydroxylation. **Chabot et al. (1992)**, ont signalé que l'activité antimicrobienne est très importante pour les substances bioactives moins polaires (n'ayant pas de groupement hydroxyle OH sur leur cycle B). En plus de la polarité des extraits, l'effet inhibiteur peut être liée à une synergie entre différents composés (**Natarajan et al., 2005 ; Yeo Sounta, 2014**), et surtout aux conditions de séchage et de broyage de la plante (**Moussaid et al., 2012**).

CONCLUSION

Afin de valoriser les vertus antibactériens de l'extrait aqueux et de l'huile essentielle d'*Euphorbia guyoniana* Boiss. & Reut, plante médicinale endémique à l'Algérie, la présente étude tente d'évaluer leur effet inhibiteur de la croissance des bactéries pathogènes isolées et identifiées de différents sol.

Au terme de cette étude, les résultats du screening phytochimique de la plante récoltée de la région de Ghardaïa a montrée une forte teneur en saponosides, alcaloïdes, lipoides, glucosides, sucres réducteurs. Elle est moyennement riche en tannins totaux, coumarines, flavonoïdes, mucilages, polyphénols. Cependant, l'espèce est dépourvue d'anthocyanes, de leuco-anthocyanes, de Tannins catéchiques, de tanins galliques, de quinones libres, d'amidon, d'irridoïdes, de protéines et de caroténoïdes. L'analyse des extraits flavonoïques de la plante par IR a révélé leur richesse en liaisons -OH à fonction phénol. L'analyse de l'extrait aqueux par HPLC, a dévoilé la présence de 41 composés flavonoïques, dont 27 ont pu être identifiés. En revanche un seul composé a été détecté et identifié par GC-MS de l'huile essentielle. Il s'agit de BIS (2-ethylhexyl) phthalate, un des constituants du latex.

L'étude microbiologique des sols choisis (poulailler, culture de pomme de terre et écurie), a permis d'identifier grâce à des examens macroscopiques, microscopiques, biochimiques et par VITEK, 16 espèces bactériennes : *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter koseri*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella spp*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus agalactiae*. Pour chaque espèce 4 à 5 souches ont été conservées.

Quant à l'activité antibactérienne des deux extraits, il a été noté une sensibilité marquée des souches testées, bien que les CMI_s des huiles essentielles n'ont pas pu être effectuées. Il est claire que l'extrait aqueux flavonoïque possède une activité antibactérienne nettement plus élevée que l'huile essentielle et ce sur toutes les souches bactérienne avec une zone d'inhibition pouvant atteindre 32 mm pour *Staphylococcus aureus*. Les CMI_s obtenues varient de 0,07mg/ml pour *Pseudomonas aeruginosa* à 61,78mg/ml pour d'*Escherichia coli*.

Il ressort du présent travail que l'extrait aqueux flavonoidique et l'huile essentielle d'*Euphorbia guyoniana* sont des produits fort intéressants et riche en possibilités thérapeutiques. Néanmoins, Ce travail reste préliminaire et peu indicatif sur le mécanisme réel par lequel agissent les flavonoïdes.

Conclusion

Par conséquent, la purification et l'identification de ces composés actifs ayant une activité antibactérienne restent fortement recommandées. Il serait souhaitable également de tester l'effet de ces extraits sur une large gamme de microorganismes (bactéries, champignons et virus). De même, effectuer des tests de toxicité et l'évaluation des autres activités biologiques (antioxydante, antidiabétique, insecticide...etc.) afin de valoriser cette espèce, et de promouvoir son intégration dans le domaine industriel.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- **Aazza, S., Lyoussi, B., et Miguel, M. G. (2011).** Antioxidant and Antiacetylcholinesterase Activities of Some Commercial Essential Oils and Their Major Compounds. *Molecules*, 16(9), 7672-7690.
- 2- **Acha, P. N. et Szyfres, B. (2001).** Zoonoses and Communicable Diseases common to man and animals, Ed. Washington DC, U.S.A, 404 p.
- 3- **Adjanohoun, E., Cusset, G., Issa, L. O., Keita, A., Lejoly, J., et Weachter, P. (1989).** Banque de données de Médecine traditionnelle et Pharmacopée(PHARMEL). Notice pour la récolte et l'entrée des données, Ed. A.C.C.T, Paris, 124 p.
- 4- **Afif Chaouche, Th. (2015).** Etude ethno-pharmacologique et évaluation de l'activité antimicrobienne et antioxydante de quelques plantes médicinales de la région de Tizi Ouzou – Algérie. Thèse de doctorat, microbiologie appliquée, Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen, Algérie, 189 p.
- 5- **AFNOR. (2000).** « Recueil de normes: les huiles essentielles. Tome 2. Monographies relatives aux huiles essentielles ». AFNOR, Paris, 663 p.
- 6- **Aggoune, N., Chabani, A., Tiouit, D., Naim, M., et Rahal, K. (2008).** Premier cas d'*Enterococcus faecalis* résistant à la vancomycine en Algérie. *Méd et mal infect*, 38, 557-558.
- 7- **Ahmed, A.A., Gherraf, N., El-Bassuony, A.A., Rhouati, S., Gad, M.H., Ohta, S., et Hirata, T. (2006).** Guyonianin A and B, 2 polyester diterpenes from Algerian *Euphorbia guyoniana*. *Natural Product Communications*, 1, 273-279.
- 8- **Al-Fatimi, M., Friederich, U., et Jenett-Siems, K. (2005).** Cytotoxicity of plant used in traditional medicine in Yemen. *Fitoterapia*, 76: 355–358.
- 9- **Allerberger, F. (2003).** Listeria: growth, phenotypic differentiation and molecular microbiology. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 35, 183-189.
- 10- **Ameha, S., Kaleab A., et Fathy, K. F. (2006).** Structure–radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry*, 67 (18), 2058.
- 11- **Amić, D., Davidović-Amić, D., Bešlo, D. et al (2007).** SAR and QSAR of the antioxidant activity of flavonoids. *Curr Med Chem*, 14, 827–845.
- 12- **An, Y. J., Kampbell, D. H., et Peter Breidenbach, G. (2002).** *Escherichia coli* and total coliforms in water and sediments at lake marinas. *Environmental Pollution*, 120, 771-778.
- 13- **Andrianarisoa, B., et Tsirinirindravo, L. H. (2009).** Antibacterial activities of leaf extract of *Dalechampia clematidifolia* (Euphorbiaceae). *Int. J. Biol. Chem. Sci*, 3(5), 1198-1202.

- 14- Arab, K., Bouchenak, O., et Yahiaoui, K. (2014).** Etude physico-chimique et évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de la Sarriette des montagnes vis-à-vis des bactéries isolées des infections urinaires. *Revue Agriculture*, 07, 12–19.
- 15- Aristidou, A. (2000).** Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. *Current Opinion in Biotechnology*, 11 (2), 187-198.
- 16- Avlessi, F., Alitonou, G.A., Djenontin, T. S., Tchobo, F., Yèhouénou, B., Menut, C., et Sohounhloué, D. (2012).** Chemical composition and Biological activities of the Essential oil extracted from the Fresh leaves of *Chromolaena odorata* (L. Robinson) growing in Benin. *ISCA Journal of Biological Sciences*, 1(3): 7-13.
- 17- Aymonier, A, et al. (2001).** Design of pressure-sensitive adhesives by free-radical emulsion copolymerization of methyl methacrylate and 2-ethylhexyl acrylate. 1. Kinetic study and tack properties. *Chemistry of Materials*, 13(8), 2562-2566.
- 18- Aynehchi, Y., et Hakimzadeh, M. Z. (1978).** Chemical examination of *Euphorbia falcata* L. *Q. J Crude Drug Res*, 16, 163-6.
- 19- Ayoola, G., Coker, H., Adesegun, S., Adepoju-Bello, A., Obaweya, K., Ezennia1, E., Atangbayila, T. (2008).** Phytochemical Screening and Antioxidant Activities of Some Selected Medicinal Plants Used for Malaria Therapy in Southwestern Nigeria. *Trop. J. Pharm Res*, 7(3), 1019-1024.
- 20- Babili, F.E., Moulis, C., Bessiere, J. M., Roques, C., et Haddioui, L. (2009).** Essential oil leaves of *Croton campestris* St. Hilaire, its secretory elements, and its biological activity. *Journal of Essential Oil Research*, 21, 272–275.
- 21- Badoc, A. (1988).** Contribution à l'étude du genre *Foeniculum* Mill. Thèse de doctorat, Biologie et physiologie végétales, Université de Lille 1, France.
- 22- Baudart, J., Lemarchand, K., Brisabois, A., et Lebaron, P. (2000).** Diversity of Salmonella strains isolated from the aquatic environment as determined by serotyping and amplification of the ribosomal DNA spacer regions. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 1544-1552.
- 23- Baxter-Potter, W. R., et Gilliland, M. W. (1988).** Bacterial pollution in runoff from agricultural lands. *Journal of Environmental Quality*, 17, 27-34.
- 24- Bech, T. B., Johnsen, K., Dalsgaard, A., Laegdsmand, M., Jacobsen, O. H. R., et Jacobsen, C. S. (2010).** Transport and distribution of Salmonella enterica serovar Typhimurium in loamy and sandy soil monoliths with applied liquid manure. *Applied and environmental microbiology*, 76, 710-714.

- 25- Bekhichi, C., et Abdelouahid, D. (2001).** Les huiles essentielles. Ed, Tec et Doc, Algérie, 50p.
- 26- Bekkal Briki, W., et Dib, F. (1999).** Contribution à l'étude des infections nosocomiales dues à *Escherichia coli* au CHU de Tlemcen - Enquête de prévalence. - Etat de résistance aux Bêtalactamines, Mémoire de fin d'étude, microbiologie, Université de Abou Bekr Belkaid de Tlemcen, 52 p.
- 27- Bellakhdar, J. (1997).** La pharmacopée marocaine traditionnelle. Médecine arabe ancienne et savoirs populaires, Eds. Le Fennec, Ibis Press, Paris – Rabat, 764 p.
- 28- Bellouni, R. (1990).** "Listeria monocytogenes", Thèse de Doctorat en médecine (DESM), INESSM, Alger, 165 p.
- 29- Benachour, A., Muller, C., Dabrowski-Coton, M., Le Breton, Y., Giard, J. C., Rincé, A., Auffray, Y., et Hartke, A. (2005).** The *Enterococcus faecalis* SigV protein is an extracytoplasmic function sigma factor contributing to survival following heat, acid, and ethanol treatments. *Journal of bacteriology*, 187, 1022-1035.
- 30- Benmeddour, T. (2016).** Etude de l'activité biologique de quelques espèces végétales dans la région des Aurès et au nord du Sahara algérien, Thèse de doctorat, biologie et physiologie végétale, Université Ferhat Abbas de Sétif 1, Algérie, 194 p.
- 31- Berg, G., Eberl, L., et Hartmann, A. (2005).** The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environmental Microbiology*, 7, 1673-1685.
- 32- Bessong, P., Rojas, L., Obi, L., Tshisikawe, P., et Igunbor, E. (2006).** Further screening of vendable medicinal plants for activity against HIV type 1 reverse transcriptase and integrase. *Afr. J. Biotechnol*, 5, 526-528.
- 33- Bettache, A. (2013).** Isolement et sélection d'actinomycètes producteurs d'enzymes cellulolytiques. Thèse de doctorat, microbiologie appliquée, Université Abderrahmane Mira de Bejaia, Algérie, 320 p.
- 34- Beuchat, L. R. (1996).** *Listeria monocytogenes*: Incidence on vegetables. *Food Control*, 7, 223-228.
- 35- Béliveau, R., et Gingras, D. (2005).** Les aliments contre le cancer. Ed. Trécarré, Paris, 213 p.
- 36- Birt, D. F., Hendrich, S., et Wang, W. (2001).** Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacology. Therapeutics*, 90, 157-177.
- 37- Botzler, R. G., Cowan, A. B., et Wetzler, T. F. (1974).** Survival of *Listeria monocytogenes* in soil and water. *Journal of Wildlife Diseases*, 10, 204-212.

- 38- Boudet, A. M. (2000).** L'usine chimique. 9ème conférence de l'université de tous les savoirs. France. p1-16.
- 39- Boudiar, T., Hichem, L., Khalfallah, A., Kabouche, A., Kabouche, Z., Brouard, I., Bermejo, J., et Bruneau, C. (2010).** A new alkaloid and flavonoids from the aerial parts of *Euphorbia guyoniana*. *Natural product communications*, 5(1), 35-37.
- 40- Boutibonnes, P., Giard, J. C., Hartke, A., Thammavongs, B., et Auffray, Y. (1993).** Characterization of the heat shock response in *Enterococcus faecalis*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 64, 47-55.
- 41- Bouzar, H., Daouzli, N., Krimi, Z., Alim, A., et Khemici, E. (1991).** Crown gall incidence in plant nurseries of Algeria, characteristics of *Agrobacterium tumefaciens* strains, and biological control of strains sensitive and resistant to agrocin 84. *Agronomie*, 11, 901-908.
- 42- Bornert, G. (2000).** Importance des bactéries psychrotrophes en hygiène des denrées alimentaires. *Médecine Vétérinaire*, 151, 1003-1010.
- 43- Boyle, W. (1955).** Spices and essential oils as perspectives. *American Perfumer Essential Oil Review*, 66, 25-28.
- 44- Brandl, M. T. (2006).** Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety. *Annu Rev Phytopathol*, 44, 367-392.
- 45- Brennan, F. P., O'Flaherty, V., Kramers, G., Grant, J., et Richards, K. G. (2010).** Long-term persistence and leaching of *Escherichia coli* in temperate maritime soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 1449-1455.
- 46- Brenner, F. W., Villar, R. G., Angulo, F. J., Tauxe, R., et Swaminathan, B. (2000).** Salmonella Nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 2465-2467.
- 47- Bruneton, J. (1996).** Plantes toxiques : Végétaux dangereux pour l'homme et les animaux. Ed. Technique et documentation, Paris, 632 p.
- 48- Bruneton, J. (1999).** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Ed. Techniques et documentation, Paris, 200 p.
- 49- Bruneton, J. (2009).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Ed. Lavoisier, Paris, 1292 p.
- 50- Brusselmans, K., Vrolix, R., Verhoeven, G., et Swinnen, J. V. (2005).** Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity. *Journal of biological chemistry*, 280 (7), 5636-5645.
- 51- Buchbauer, G., et Jirovetz, L. (1994).** Aromatherapy- Use of fragrances and essential oils as medicaments. *Flavour and Fragrance J*, 9, 217 -222.

- 52- Bui, X. T., Wolff, A., Madsen, M., et Bang, D. D. (2012). Interaction between food-borne pathogens (*Campylobacter jejuni*, *Salmonella Typhimurium* and *Listeria monocytogenes*) and a common soil flagellate (*Cercomonas sp.*). *Journal of Food Research*, 1, 76.
- 53- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. *Int. J. Food Microbiol*, 94, 223–253.
- 54- Byappanahalli, M. N., Whitman, R. L., Shively, D. A., Sadowsky, M. J., et Ishii, S. (2006). Population structure, persistence, and seasonality of autochthonous *Escherichia coli* in temperate, coastal forest soil from a Great Lakes watershed. *Environmental Microbiology*, 8, 504-513.
- 55- Byappanahalli, M. N., Roll, B. M., et Fujioka, R. S. (2012). Evidence for occurrence, persistence, and growth potential of *Escherichia coli* and Enterococci in Hawaii's soil environments. *Microbes and Environments*, 27, 164-170.
- 56- Bylka, W., Mathawska, I., et Pilewski, N. A. (2004). Natural flavonoid as antimicrobial agents. *Journal of the American Nutraceutical Association*, 7 (2), 24-26.
- 57- Cadel Six, S., De Buyser, M.L., Vignaud, M.L., Dao, T.T., Messio, S., Pairaud, S., Hennekinne, J.A., Pihier, N., Brisabois, A. (2012). Toxi-infections alimentaires collectives à *Bacillus cereus*: bilan de la caractérisation des souches de 2006 à 2010. *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation/S spécial Risques alimentaires microbiologiques*, 50, 57–61.
- 58- Celiktaş, O. Y., Hames Kocabas, E. E., Bedir, E., Vardar Sukan, F., Ozek, T., et Base, K. H. C. (2007). Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chem*, 100(2), 553-559.
- 59- Chaabi, M., Freund-Michel, V., Frossard, N., Randrianitsoa, A., Andriantsitohaina, R., et Lobstein, A. (2007). Anti-proliferative effect of *Euphorbia stenoclada* in human airway smooth muscle cells in culture. *J. Ethnopharmacology*, 109 (1), 134-139.
- 60- Chabot, S., Bel-Rhlid, T., Chenevert, R., Piche, Y. (1992). Hyphae growth promotion in vitro of the VA mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker & Hall, by the activity of structurally specific flavonoid compounds under CO₂-enriched conditions. *New Phytologist*, 122, 461-467.
- 61- Champy, P. (2008). Plantes toxiques. UFR. Pharmacie, Université Paris- Sud, 47 p.
- 62- Chang, S. T., et Chan, S. P. F. (2001). Antibacterial activity of leaf essential oils and components from *Cinnamomum osmophloeum*. *J. Ethnopharmacol*, 77, 123-127.

- 63- Chao, H., Wang, Y., Tang, S., et Liu, H. (2004). A highly sensitive immuno- polymerase chain reaction assay for *Clostridium botulinum* neurotoxin type A. *Toxicon*, 43 (1), 27-34.
- 64- Chaussod, R., Zuvia, M., Breuil, M., Hetier, J. (1992). Biomasse microbienne et statut organique des sols tropicaux : exemple d'un sol vénézuélien des llanos sous différents systèmes de culture. *cahiers. Orstom pédologie*, 28(1), 59-67.
- 65- Chehma, A. (2006). Catalogue des plantes spontanées du Sahara septentrional algérien. mémoire de fin d'étude, biologie, Université Kasdi Merbah Ouargla, Algérie, 140 p.
- 66- Chenoweth, C., et Schaberg, D. (1990). The epidemiology of enterococci. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 9, 80-89.
- 67- Cimanga, K., Kambu, K., Tona, L., Apers, S., Bruyne, T., Hermans, N., Totte, J., Pieters, L., et Vlietinck, A. J. (2002). Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology*, 79(2), 213-220.
- 68- Coker, C., Poore, C. A., Li, X., et Mobley, H. L. (2000). Pathogenesis of *Proteus mirabilis* urinary tract infection. *Microbes and Infection / Institut Pasteur*, 2(12), 1497-1505.
- 69- Colburn, K. G., Kaysner, C. A., Abeyta, C., et Wekell, M. M. (1990). *Listeria* species in a California coast estuarine environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 2007-2011.
- 70- Colinon, C., Deredjian, A., Hien, E., Brothier, E., Bouziri, L., Cournoyer, B., Hartman, A., Henry, S., Jolivet, C., Ranjard, L. (2013). Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* in soil and manure assessed by an *ecfX* qPCR assay. *Journal of applied microbiology*, 114, 1734-1749.
- 71- Collins, A. (2001). A class project for PP728 Soilborn Plant pathogens. North Carolina State University. Department of Plant Pathology. USA.
- 72- Cools, D., Merckx, R., Vlassak, K., et Verhaegen, J. (2001). Survival of *E. coli* and *Enterococcus spp.* derived from pig slurry in soils of different texture. *Applied Soil Ecology*, 17, 53-62.
- 73- Cosentino, S., Tuberoso, C. I. G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E., et Palmas, F. (1999). In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Lett. Appl. Microbiol*, 29, 130-135.
- 74- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12 (4), 564-570.

- 75- Crane, S. R., et Moore, J. A. (1986). Modeling enteric bacterial die-off - A review. *Water Air and Soil Pollution*, 27, 411-439.
- 76- Creti, R., Imperi, M., Bertuccini, L., Fabretti, F., Orefici, G., Di Rosa, R., Baldassarri, L. (2004). Survey for virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated from different sources. *J Med Microbiol*, 53(Pt 1), 13-20.
- 77- Cruz, S. E. S. B., Beelen, P. M. G., Silva, D. S., Pereira, W. E., Beelen, R., et Beltrao, F. S. (2007). Characterization of condensed tannin of the species manicoba (*Manihot pseudoglaziovii*), flor-de-seda (*Calotropis procera*), feijao-bravo (*Capparis flexuosa*) and jureminha (*Desmanthus virgatus*). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, 59 (4), 1038-1044.
- 78- Curriero, F. C., Patz, J. A., Rose, J. B., et Lele, S. (2001). The association between extreme precipitation and waterborne disease outbreaks in the United States. *Journal Information*, 1948-1994.
- 79- D'Archivio, M., Carmela, F., Roberta, B., Raffaella, G., Claudio, G., et Roberta, M. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanità*, 43(4), 348-361.
- 80- Da Silva, M. F., Tiago, I., Veríssimo, A., Boaventura, R. A. R., Nunes, O. C., et Manaia, C. M. (2006). Antibiotic resistance of enterococci and related bacteria in an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiology Ecology*, 55, 322-329.
- 81- Daglia, M. (2011). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23, 1-8.
- 82- Danyluk, M. D., Nozawa-Inoue, M., Hristova, K. R., Scow, K. M., Lampinen, B., et Harris, L. J. (2008). Survival and growth of *Salmonella Enteritidis* PT 30 in almond orchard soils. *Journal of applied microbiology*, 104, 1391-1399.
- 83- De Bilierbeck, V. G. (2000). Activité fongique de l'huile essentielle de *Cymbopogon nardus* sur *Aspergillus niger*! Evaluation d'un bioréacteur pour l'étude de l'effet des substances volatiles en phase vapeur. Thèse de doctorat, sciences pharmaceutiques, Institut national polytechnique de Toulouse, France, 236 p.
- 84- Decloitre, F. (1993). Impact des facteurs alimentaires sur les mécanismes de la cancérogénèse: bases d'une prévention des cancers par l'alimentation. *Cahiers de Nutrition et de diététique*, 28 (2), 85-95.
- 85- De Nazaré, D., Sebastião, F., Palmeira, J., Conserva, L., et Lyra Lemos, R. (2005). Quinoline alkaloids from *Sebastiania corniculata* (Euphorbiaceae). *Biochem. Syst. Ecol*, 33(5), 555-558.

- 86- Depeint, F., Gee, J. M., Williamson, G., et Johson, I. T. (2002).** Evidence for consistent patterns between flavonoid structures and cellular activities. *Proceeding of the Nutrition Society*, 61, 97-103.
- 87- Descourtieux, P.H., et Combe, A., et al. (1988).** Nouvelle utilisation d'*Euphorbia Hirta* en thérapeutique (anxiolitique), Demande de Brevet d'Invention, France. 13 p.
- 88- Dazzo, F., Smith, P., et Hubbell, D. (1973).** The influence of manure slurry irrigation on the survival of fecal organisms in Scranton fine sand. *Journal of Environmental Quality*, 2, 470-473.
- 89- De Cliff S et Harerimana P- C. (2014).** Extraction de l'Huile Essentielle Complète des Fleurs de *Cananga Odorata* de la Plaine de l'Imbo : Vers la Vulgarisation d'une Nouvelle Filière de Plante Industrielle au Burundi. *Revue de l'Université du Burundi -Série Sciences Exactes*. 28 : 1- 17.
- 90- Deering, A. J., Mauer, L. J., et Pruitt, R. E. (2012).** Internalization of *E. coli* O157: H7 and *Salmonella spp.* in plants: A review. *Food Research International*, 45, 567-575.
- 91- Devriese, L. A., Pot, B., et Collins, M. D. (1993).** Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. *Journal of Applied Microbiology*, 75, 399-408.
- 92- Dias, G., Porto, C., Stuker, C., Graessler, V., Burrow, R., Dalcol, I., da Silva, U., et Morel, A., (2007).** Alkaloids from *Melochia chamaedrys*. *Planta Med*, 73, 289-292.
- 93- Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A. A., et Capasso, F. (1999).** Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci*, 65(4), 337-53.
- 94- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., et Vidal, N. (2006).** Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem*, 97(4), 654-660.
- 95- Dorman, H. J. D., et Deans, S. G. (2000).** Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 308-316.
- 96- Dowe, M. J., Jackson, E. D., Mori, J. G., et Bell, C. R. (1997).** *Listeria monocytogenes* survival in soil and incidence in agricultural soils. *Journal of Food Protection*, 60, 1201-1207.
- 97- Duprè, I., Zanetti, S., Schito, A. M., Fadda, G., et Sechi, L. A. (2003).** Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates collected in Sardinia (Italy). *Journal of medical microbiology*, 52, 491-498.
- 98- Edris, A. E. (2007).** Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review. *Phytotherapy Research*, 21, 308-323.

- 99- **EFSA (2007)**. Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from EFSA on monitoring of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and identification of human pathogenic VTEC types. *The EFSA journal*, 579: 1- 61.
- 100- **EFSA (2011)**. Technical Guidance on the assessment of the toxigenic potential of *Bacillus* species used in animal nutrition. *EFSA Journal*, 9(11): 2445.
- 101- **EFSA (2011)**. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and food-borne outbreaks 2009. *EFSA Journal* 9.
- 102- **Ekpo, O.E., et Pretorius, E. (2007)**. Asthma, *Euphorbia hirta* and its anti-inflammatory properties. *S. Afr. J. Sci*, 103(5/6), 201-203.
- 103- **Elicoh-Middleton, J. R., Chithan, K., et Theoharis, C. (2000)**. Effect of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart diseases and cancer. *Pharmacology and Experimental therapeutics*, 4(52), 673-751.
- 104- **Emerenciano, M. G., Wasielesky, W. J., Soares, R. B., Ballester, E. C., Izeppi, E. M., et Cavalli, R. O. (2007)**. Crescimento e sobrevivência do camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*) na fase de berçário em meio heterotrófico. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 29(1), 1-7.
- 105- **Erdman, J. W., Balentine, L., Arab, G., Beecher, J. T., Dwyer, J., Folts, J., Harnly, et al. (2007)**. Flavonoids and heart health: proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop. *J Nutr*, 137 (3 Suppl 1), 718s-737s.
- 106- **Erickson, M. C. (2012)**. Internalization of fresh produce by foodborne pathogens. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3, 283-310.
- 107- **Esmeraldino, L. E., Souza, A. M., et Sampa, S. V. (2005)**. Evaluation of the effect of aqueous extract of *Croton Urucurana Baillon* (Euphorbiaceae) on the hemorrhagic activity induced by the venom of *Bothrops jararaca*, using new techniques to quantify hemorrhagic activity in rat skin. *Phyt. Dicinem*, 12 (8), 570- 576.
- 108- **Esteban, J., Oporto, B., Aduriz, G., Juste, R., et Hurtado, A. (2009)**. Faecal shedding and strain diversity of *Listeria monocytogenes* in healthy ruminants and swine in Northern Spain. *BMC Veterinary Research*, 5, 2.
- 109- **Fadili, K., Amalich, S., N'Dedianhoua, S.K., Bouachrine, M., Mahjoubi, M., EL hilali, F. et Zair, T. (2015)**. Polyphenols content and antioxidant activity of two species from Moroccan High Atlas: *Rosmarinus officinalis* and *Thymus satureioides*. *International Journal of Innovation and Scientific Research*, (17), 24-33.

- 110- Farber, J. M., et Peterkin, P. I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev*, 55, 476-511.
- 111- Fardoux, J., Fernandes, P., Niane-Badiane, A., Chotte, J. (2000). Effet du séchage d'échantillons d'un sol ferrugineux tropical sur la détermination de la biomasse microbienne comparaison de deux méthodes biocidales de référence. *étude et gestion des sols*, 7(4), 385-394.
- 112- Fazeli, M. R., Amin, G., Ahmadian-Attari, M. M., Ashtiani, H., Jamalifar, H., et Samadi, N. (2007) Antimicrobial activities of Iranian sumac and avishan-e shirazi (*Zataria multiflora*) against some food-borne bacteria. *Food Control*, 18, 646-649.
- 113- Fernandez-Alvarez, R. M., Carballo-Cuervo, S., La Rosa-Jorge, D., Carmen, M., et Lecea, J. R.-d. (1991). The influence of agricultural run-off on bacterial populations in a river. *Journal of Applied Microbiology*, 70, 437-442.
- 114- Fisher, K., et Phillips, C. (2009). The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*, 155, 1749-1757.
- 115- Flahaut, S., Frere, J., Boutibonnes, P., et Auffray, Y. (1996). Comparison of the bile salts and sodium dodecyl sulfate stress responses in *Enterococcus faecalis*. *Applied and environmental microbiology*, 62, 2416-2420.
- 116- Flahaut, S., Laplace, J. M., Frere, J., et Auffray, Y. (1998). The oxidative stress response in *Enterococcus faecalis*: relationship between H₂O₂ tolerance and H₂O₂ stress proteins. *Letters in applied microbiology*, 26, 259-264.
- 117- Flemming, C. A., Leung, K. T., Lee, H., Trevors, J. T., et Greer, C. W. (1994). Survival of lux-lac-marked biosurfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* UG2L in soil monitored by nonselective plating and PCR. *Appl. Environ. Microbiol*, 60(5), 1606-1613.
- 118- Fontage, C., et Chauchard, F. (2009). Introduction à l'apport des techniques proche infrarouge pour le contrôle des procédés de l'industrie pharmaceutique et démarche PAT, *TECHNOLOGIE APPLIQUÉE*, 269, 27-35.
- 119- Foulquié Moreno, M. R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., et De Vuyst, L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 1-24.
- 120- Franz, C. M. A. P., Holzappel, W. H., et Stiles, M. E. (1999). Enterococci at the crossroads of food safety?. *International journal of food microbiology*, 47, 1-24.

- 121- Franz, C. M. A. P., Stiles, M. E., Schleifer, K. H., et Holzapfel, W. H. (2003). Enterococci in foods - a conundrum for food safety. *International journal of food microbiology*, 88, 105-122.
- 122- Franz, E., Semenov, A. V., Termorshuizen, A. J., de Vos, O. J., Bokhorst, J. G., et Van Bruggen, A. H. C. (2008). Manure-amended soil characteristics affecting the survival of *E. coli* O157 : H7 in 36 Dutch soils. *Environmental Microbiology*, 10, 313-327.
- 123- Freitag, N. E., Port, G. C., et Miner, M. D. (2009). *Listeria monocytogenes* - from saprophyte to intracellular pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, 7, 623-628.
- 124- Fujioka, R., Sian-Denton, C., Borja, M., Castro, J., et Morpew, K. (1998). Soil: the environmental source of *Escherichia coli* and Enterococci in Guam's streams. *Journal of applied microbiology*, 85, 83S-89S.
- 125- Gagliardi, J. V., et Karns, J. S. (2000). Leaching of *Escherichia coli* O157 : H7 in diverse soils under various agricultural management practices. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4172-4172.
- 126- Garcia, R., Baelum, J., Fredslund, L., Santorum, P., et Jacobsen, C. S. (2010). Influence of temperature and predation on survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and expression of *invA* in soil and manure-amended soil. *Applied and environmental microbiology*, 76, 5025-5031.
- 127- Garnier, F., et Denis, F. (2007). Bactériologie médical : Techniques usuelles : Cocci à Gram positif, Ed. Masson, France, 600 p.
- 128- Garrec, N., Picard-Bonnaud, F., et Pourcher, A. M. (2003). Occurrence of *Listeria* sp and *L. monocytogenes* in sewage sludge used for land application: effect of dewatering, liming and storage tank on survival of *Listeria* species. *Fems Immunology and Medical Microbiology*, 35, 275-283.
- 129- Gendrel, D. (1997). Salmnelloses de l'enfant. *Encycl. Med. Chir, Maladies infectieuse*.
- 130- Girardin, H., Morris, C. E., Albagnac, C., Dreux, N., Glaux, C., et Nguyen-The, C. (2005). Behaviour of the pathogen surrogates *Listeria innocua* and *Clostridium sporogenes* during production of parsley in fields fertilized with contaminated amendments. *FEMS Microbiology Ecology*, 54, 287-295.
- 131- Giraffa, G. (2002). Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Reviews*, 26, 163-171.

- 132- **González-Gallego, J., Sánchez-Campos, S., et Tuñón, M. J. (2007).** Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutricion Hospitalaria*, 22(3), 287-293.
- 133- **Goodner, B., Hinkle, G., Gattung, S., Miller, N., Blanchard, M., Quorllo, B., Goldman, B. S., Cao, Y., Askenazi, M., Halling, C., Mullin, L., Houmiel, K., Gordon, J., Vaudin, M., Iartchouk, O., Epp, A., Liu, F., Wollam, C., Allinger, M., Doughty, D., Scott, C., Lappas, C., Markelz, B., Flanagan, C., Crowell, C., Gurson, J., Lomo, C., Sear, C., Strub, G., Cielo, C., et Slater, S.(2001).** Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science*, 294(5550), 2323-8.
- 134- **Goulet, V., Leclercq, A., Laurent, É., King, L., Chenal-Francisque, V., Vaillant, V., Letort, M.J., Lecuit, M., et de Valk, H. (2012).** Surveillance de la listériose humaine en France, 1999-2011. Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation no 50 / Spécial Risques alimentaires microbiologiques.
- 135- **Graf, B. A., Milbury, P. E., et Blumberg, J. B. (2005).** Flavonols, flavones, flavanones, and human health: epidemiological evidence. *J Med Food*, 8(3), 281-90.
- 136- **Granum, P. E. (2005).** *Bacillus cereus*. In Foodborne pathogens: microbiology and molecular biology, Ed. Caister Academic Press, U.K, 457 p.
- 137- **Graves, L. M., Helsel, L. O., Steigerwalt, A. G., Morey, R. E., Daneshvar, M. I., Roof, S. E., Orsi, R. H., Fortes, E. D., Milillo, S. R., et Den Bakker, H. C. (2010).** *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60, 1280-1288.
- 138- **Gray, M. L., et Killinger, A. H. (1966).** *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriology Reviews*, 30, 309–382.
- 139- **Grimont, P. A. D., Grimont, F. et Bouvet, P. (2000).** Taxonomy of the Genus *Salmonella*. In *Salmonella in Domestic Animals*, C. Wray and A. Wray Eds. *CAB International*, 261 (7), 1-17.
- 140- **Grimont, P. A. D. et Weill, F. X. (2007).** Formules antigéniques des sérovars de *Salmonella*. *WHO collaborating centre for reference and research on Salmonella*, 9, 1-166.
- 141- **Gubb, A. S. (1913).** La flore Saharienne: Un aperçu photographique, Ed. Adolphe Jourdan, Alger, 129 p.
- 142- **Guo, X., Chen, J., Brackett, R. E., et Beuchat, L. R. (2001).** Survival of salmonellae on and in tomato plants from the time of inoculation at flowering and early stages of fruit

- development through fruit ripening. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 4760-4764.
- 143- **Guo, X., van Iersel, M. W., Chen, J., Brackett, R. E., et Beuchat, L. R. (2002).** Evidence of association of salmonellae with tomato plants grown hydroponically in inoculated nutrient solution. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 3639-3643.
- 144- **Haba, H., Lavaud, C., Harkat, H., Magid, A. A., Marcourt, L., et Benkhaled, M. (2007).** Diterpenoids and triterpenoids from *Euphorbia guyoniana*. *Phytochemistry*, 68, 1255-1260.
- 145- **Haba, H. (2008).** Etude phytochimique de deux Euphorbiaceae sahariennes: *Euphorbia guyoniana* Boiss. et Reut. et *Euphorbia retusa* Forsk. Thèse de doctorat, chimie, faculté des sciences, Université EL HADJ LAKHDAR Batna, Algérie, 305 p.
- 146- **Haeghebaert, S. (2003).** Caractéristiques épidémiologiques du botulisme humain en France. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire*, 129- 130.
- 147- **Harbone, J. B. (1986).** The role of phytoalexins in natural plant resistance. *ACS Symposium series*, 97, 23-35.
- 148- **Harborne, J. B., et Williams, C. A. (2000).** Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55, 481-504.
- 149- **Hart, C. A. (2006).** *Klebsiella, Citrobacter, Enterobacter* and *Serratia spp.* In: Principles and practice of Clinical Bacteriology. Ed. John Wiley and Sons, England, UK, 620 p.
- 150- **Hattori, T., Hattori, R., et McLaren, A. D. (1976).** The physical environment in soil microbiology: an attempt to extend principles of microbiology to soil microorganisms. *Critical Reviews in Microbiology*, 4, 423-461.
- 151- **Havsteen, B. H. (2002).** The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics*, 96, 67-202.
- 152- **Hegstad, K., Mikalsen, T., Coque, T. M., Werner, G., et Sundsfjord, A. (2010).** Mobile genetic elements and their contribution to the emergence of antimicrobial resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Clinical Microbiology and Infection*, 16, 541-554.
- 153- **Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., et Bobilya, D. J. (2002).** Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem*, 13, 527-584.
- 154- **Hernández, T., Canales M., Avila J.G., Duran A., Caballero J., Romo de Vivar, A., et Lira R. (2003).** Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in

- traditional medicine of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México). *Journal of Ethnopharmacology*, 88 (2-3), 181-188.
- 155- **Hernandez-Ochoa, L.R. (2005).** Substitution des solvants et matières actives de synthèse par combiné “solvent/Actif” d’origine végétale. Thèse de doctorat, chimie agro-industrielle, Institut National Polytechniques de Toulouse, France, 225 p.
- 156- **Herouini, A., Kemassi, A., et Ould El Hadj, M. D. (2015).** Etude de l’activité biologique des extraits aqueux d’*Euphorbia guyoniana* (*Euphorbiaceae*) récoltée dans Oued Sebseb (Sahara Algérien). *el-wahat*, 8(2), 15 – 25.
- 157- **Hertog, M. G. (1996).** Epidemiological evidence on potential health properties of flavonoids. *Proceeding of the nutrition society*, 55 (1B), 385-397.
- 158- **Hélia, V. (2008).** *Pectobacterium spp.* et *Dickeya spp.* de la pomme de terre : nouvelle nomenclature pour *Erwinia spp.*, symptomatologie, épidémiologie et prophylaxie, *C. Agricultures*, 4, 349-354.
- 159- **Hirneisen, K. A., Sharma, M., et Kniel, K. E. (2012).** Human enteric pathogen internalization by root uptake into food crops. *Foodborne pathogens and disease*, 9, 396-405.
- 160- **Hof, H., Hefner, P. (1988).** Pathogenicity of *Listeria monocytogenes* in comparison to other *Listeria* species. *Infection*, 16, S141-S144.
- 161- **Holley, R. A., Arrus, K. M., Ominski, K. H., Tenuta, M., et Blank, G. (2006).** *Salmonella* survival in manure-treated soils during simulated seasonal temperature exposure. *Journal of environmental quality*, 35, 1170-1180.
- 162- **Holm, L., Del, Y., Holm, E., Panchon, T., et Herberger, T. (1997).** World weeds. Natural Histories and Distributions. Ed. John Wiley et sons, New York, 1129 p.
- 163- **Hosahally, R. V., Ganapaty, S., Prasanna, S. S., Vijaya, G. J., Kishori, P. S., et Asif, A. K. (2012).** Phytochemical and pharmacological evaluation of *Tragia cannabina* for anti-inflammatory activity. *International Current Pharmaceutical Journal*, 1(8), 213-216.
- 164- **Hölzel, C. S., Schwaiger, K., Harms, K., Küchenhoff, H., Kunz, A., Meyer, K., Müller, C., et Bauer, J. (2010).** Sewage sludge and liquid pig manure as possible sources of antibiotic resistant bacteria. *Environmental Research*, 110, 318-326.
- 165- **Hunsa, P., Chulabhorn, M., Ruchirawat, S., Prawat, U., Tuntiwachwuttikul, P., Tooptakong, U., Taylor, W. C., Pakawatchai, C., Brian, W., Skelton, et Allen, H. (1995).** White Cyanogenic and non-cyanogenic glycosides from *Manihot esculenta*. *Phytochemistry*, 40 (4), 1167-1173.

- 166- **Hutzler, P., Fischbach, R., Heller, W., Jungblut, T. P., Reuber, S., Schmitz, R., Veit, M., Weissenbock, G., et Schnitzler, J. P. (1998).** Tissue localization of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy. *J Exp Bot*, 4, 953–965.
- 167- **Hwang, E., Ahn, B., Lee, H., Kim, Y., Lee, K., Bok, S., Kim, Y., et Kim, S. (2001).** Inibitory activity for chitin synthase II from *Saccharomyces cerevisiae* by tannins and related compounds. *Planta Med*, 67, 501-504.
- 168- **Inouye, S. et al., (2001).** Screening of the antibacterial effect of a variety of essential oils on respiratory tract pathogens, using a modified dilution assay method. *J Infect. Chemother*, 7, 251-254.
- 169- **Islam, M., Morgan, J., Doyle, M. P., Phatak, S. C., Millner, P., et Jiang, X. (2004a).** Persistence of salmonella enteric serovar Typhimurium on lettuce and parsley and in soils on which they were grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *Foodborn pathogens and disease*, 1, 27-35.
- 170- **Islam, M., Morgan, J., Doyle, M. P., Phatak, S. C., Millner, P., et Jiang, X. (2004b).** Fate of Salmonella enterica serovar Typhimurium on carrots and radishes grown in fields treated with contaminated manure composts or Irrigation water. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 2497-2502.
- 171- **Islam, M., Morgan, J., Doyle, M. P., Phatak, S. C., Millner, P., et Jiang, X. (2005).** Survival of Escherichia coli O157:H7 in soil and on carrots and onions grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *Food microbiology*, 22, 63- 70.
- 172- **Jablasone, J., Warriner, K., et Griffiths, M. (2005).** Interactions of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium* and *Listeria monocytogenes* plants cultivated in a gnotobiotic system. *International Journal of Food Microbiology*, 99, 7-18.
- 173- **Jacobsen, C. S., et Bech, T. B. (2012).** Soil survival of Salmonella and transfer to freshwater and fresh produce. *Food Research International*, 45, 557-566.
- 174- **Jacques, B., André, R. (2004).** Biochimie métabolique. Ed. ellipses, Paris, 285 p.
- 175- **Jamieson, R. C., Gordon, R. J., Sharples, K. E., Stratton, G. W., Madani, A. (2002).** Movement and persistence of faecal bacteria in agricultural soils and subsurface water: A review. *Canadian biosystems engineering*, 44, 1-9.
- 176- **Jensen, G., Hansen, B., Eilenberg, J., et Mahillon, J. (2003).** The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. *Environmental Microbiology*, 5(8), 631–640.

- 177- **Jett, B. D., Huycke, M. M., et Gilmore, M. S. (1994).** Virulence of enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 7, 462-478.
- 178- **Jeruto, P., Lukhoba, C., Ouma, G., Mutai, C., et Otieno, D. (2008).** An Ethnobotanical study of medicinal plants used by the Nandi people in Kenya. *Journal of Ethnopharmacology*, 116, 370-376.
- 179- **Jiang, X. P., Morgan, J., et Doyle, M. P. (2002).** Fate of *Escherichia coli* O157 : H7 in manureamended soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 2605-2609.
- 180- **Jin, G., Jeng, H. W., Bradford, H., et Englande, A. J. (2004).** Comparison of *E. coli*, *enterococci*, and *fecal* coliform as indicators for brackish water quality assessment. *Journal Water Environ*, 76(3), 245-55.
- 181- **Johnson, I. (1999).** Antioxydants et anticancereux. *Biofutur*, 186, 14-17.
- 182- **Jourdan-Da Silva, N., et Le Hello, S. (2010).** Salmonelloses en France, 2002-2010 : tendances en épidémiologie humaine, émergence de la souche monophasique, principaux aliments impliqués dans les dernières épidémies. *Bulletin épidémiologique - santé animale-alimentation*, 31-35.
- 183- **Karray-Bouraoui, N., Rabhi, M., Neffati, M., Baldan, B., Ranieri, A., et Marzouk, B. (2009).** Sait effect on yield and composition of shoot essential oil and trichome morphology and density on leaves of *Menthapulegium*. *Industrial Crops and Products*, 30, 338-343.
- 184- **Kenneth, T. (2012).** Online Textbook of Bacteriology. Ed. Madison, University of Wisconsin, USA.
- 185- **Kemassi, A., Boukhari, K., Cherif, R., Ghada, K., Bendaken, N., Bouziane, N., Boual, Z., Bouras, N., Ould Elhadj-Khelil, A., et Ould Elhadj, M. D (2015).** Evaluation de l'effet larvicide de l'extrait aqueux d'*Euphorbia guyoniana* (Boiss. & Reut.) (*Euphorbiaceae*). *ElWahat pour les Recherches et les Etudes*, 8 (1), 44 – 61.
- 186- **Kettani Halabi, M. (2012).** Etude de la diversité de *Pectobacterium* spp et des effets induits par les lipopolysaccharides chez les plantes. Thèse de doctorat. Université HASSANI II MOHAMMEDIA, Maroc. 219 p.
- 187- **Kibbey, H. J., Hagedorn, C., et McCoy, E. L. (1978).** Use of fecal Streptococci as indicators of pollution in soil. *Applied and environmental microbiology*, 35, 711-717.
- 188- **Kiem, P., Thua, V., Yen, P., Nhien, N., Tung, N., Cuong, N., Minh, C., Huong, H., Hyun, J., Kang, H., et Kim, Y. (2009).** New triterpenoid saponins from *Glochidion eriocarpum* and their cytotoxic activity. *Chem. Pharm. Bull*, 57, 102-105.

- 189- Kim, B. N., Kim, N. J., Kim, M. N., Kim, Y. S., Woo, J. H., et Ryu, J. (2003). Bacteraemia due to tribe Proteaceae: a review of 132 cases during a decade (1991-2000). *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 35(2), 98-103.
- 190- Klein, M., Brown, L., Tucker, R. W., Ashbolt, N. J., Stuetz, R. M., et Roser, D. J. (2010). Diversity and abundance of zoonotic pathogens and indicators in manures of feedlot cattle in australia. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 6947-6950.
- 191- Klotoe, J. R., Ategbro, J. M., Dougnon, V., Loko, F., et Dramane, K (2017). Hemostatic Effect of *Jatropha multifida* L. (Euphorbiaceae) in Rats Having Coagulation Disorders. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 5 (05), 26-29.
- 192- Kone, W. M., et Kamanzi Atindehou. (2006). Inventaire ethnomédical et évaluation de l'activité anthelminthique des plantes médicinales utilisées en côte d'ivoire contre les helminthiases intestinales. *Pham. Méd. Trad. Afr*, XIV, 55-72.
- 193- Köppen et Geiger. (2001). Classification des climats de Köppen dans Introduction à la climatologie: Le rayonnement et la température, l'atmosphère, l'eau, le climat et l'activité humaine, page 12, Presses Université Laval, 2001.
- 194- Korsak, N., et Clinquart, A. G. D. (2004). *Salmonella spp.* dans les denrées alimentaires d'origine animale : un réel problème de santé publique ? *Annales de Médecine Vétérinaire*, 148, 174-193.
- 195- Kotiranta, A., Lounatmaa, K., et Haapasalo, M. (2000). Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes and Infections*, 2 (2), 189-198.
- 196- Kouamé-Bi, K. (2012). Valorisation de quatre plantes médicinales Ivoiriennes : étude phytochimique. Thèse de doctorat, chimie organique, Université de Nantes et Université de Cocody-Abidjan, France et Cote d'Ivoire, 180 p.
- 197- Kroupitski, Y., Golberg, D., Belausov, E., Pinto, R., Swartzberg, D., Granot, D., et Sela, S. (2009). Internalization of *Salmonella enterica* in leaves is induced by light and involves chemotaxis and penetration through open stomata. *Applied and environmental microbiology*, 75, 6076-6086.
- 198- Kutter, S., Hartmann, A., et Schmid, M. (2006). Colonization of barley (*Hordeum vulgare*) with *Salmonella enterica* and *Listeria spp.* *FEMS Microbiology Ecology*, 56, (2, 1), 262-271.
- 199- Kühn, I., Iversen, A., Burman, L. G., Olsson-Liljequist, B., Franklin, A., Finn, M., Aarestrup, F., Seyfarth, A. M., Blanch, A. R., et Vilanova, X. (2003). Comparison of

- enterococcal populations in animals, humans, and the environment - a European study. *International journal of food microbiology*, 88, 133-145.
- 200- **Lahouel, M. (2005).** Interaction flavonoïdes mitochondrie et rôle de la propolis dans la prévention de l'apoptose induite par certains médicaments anticancéreux. Thèse de doctorat, toxicologie, Université des frères Mentouri de Constantine, Algérie, 109 p.
- 201- **Laoufi, R. (2017).** Caractérisation physico-chimique et biologique des extraits d'une plante médicinale algérienne de la famille d'*Urticaceae* en vue d'une application biotechnologique. Thèse de doctorat, biochimie- Immunologie, Université M'hamed bouguera de Boumerdès, Algérie, 184 p.
- 202- **Lebres, E. H. A., et Mouffok, F. (2000).** "Enquête de listériose en Algérie", Recueil de la journée : Institut Pasteur d'Algérie face aux problèmes sanitaires de l'été. pp. 11-22.
- 203- **Leclerc, H., Devriese, L. A., et Mossel, D. A. A. (1996).** Taxonomical changes in intestinal (faecal) enterococci and streptococci: consequences on their use as indicators of faecal contamination in drinking water. *Journal of Applied Microbiology*, 81, 459-466.
- 204- **Leclercq, A., Clermont, D., Bizet, C., Grimont, P. A. D., Le Flèche-Matéos, A., Roche, S. M., Buchrieser, C., Cadet-Daniel, V., Le Monnier, A., et Lecuit, M. (2010).** *Listeria rocourtiae* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60, 2210-2214.
- 205- **Lee, K. W., Kim, Y. J., Lee, H. J., et Lee, C. Y. (2003).** Cocoa Has More Phenolic Phytochemicals and a Higher Antioxidant Capacity than Teas and Red Wine. *J. Agric. Food Chem*, 51, 7292-7295.
- 206- **Lewu, F. B. et Afolayan, A. J. (2009).** Ethnomedicine in South Africa: The role of weedy species. *African Journal of Biotechnology*, 8 (6), 929-934.
- 207- **Lhuillier, A. (2007).** Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes Malgaches: *Agauria salicifolia* Hook. f ex Oliver, *Agauria polyphylla* Baker (Ericaceae), *Tambourissa trichophylla* Baker (Monimiaceae) et *Embelia concinna* Baker (Myrsinaceae). Thèse de doctorat, science des agroressources, Institut National Polytechnique de Toulouse, France. 214 p.
- 208- **Li, Y., Li, M., Wang L., Jiang Z., Li W., et Li H. (2004).** Induction of apoptosis of cultured hepatocarcinoma cell by essential oil of *Artemisia annul* L. *Sichuan Da ue Xue Bao Yi Xue Ban*, 35, 337-339.

- 209- **Li, B., Wang, X., Chen, R., Weiguo Huangfu, W., et Xie, G. (2008).** Antibacterial activity of chitosan solution against *Xanthomonas* pathogenic bacteria isolated from *Euphorbia pulcherrima*. *Carbohydrate Polymers*, 72: 287-292.
- 210- **Li, Y., Fabiano-Tixier, A. S., Chemat, F. (2014).** Evaluation of alternative solvents for improvement of oil extraction from rapeseeds. *Comptes Rendus. Chimie*, 17, 242-251.
- 211- **Lister, D. J., Philip, D., Wolter., et Nancy, D. H. (2009).** Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. *Clin Microbiol Rev*, 22(4), 582–610.
- 212- **Liu, K., Lin, M., Lee, S., Chiou, J., Ren, S., et Lien, E. (1999).** Antiviral tannins from two *Phyllanthus* species. *Planta Med*, 65, 43-46.
- 213- **Liu, D. (2006).** Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *Journal of Medical Microbiology*, 55, 645-659.
- 214- **Liu, Y., Murakami, N., Ji, H., Abreu, P., et Zhang, S. (2007).** Antimalarial flavonoglycosides from *Euphorbia hirta*. *Pharm. Biol*, 45, 278-281.
- 215- **Locatelli, A. (2015).** Prévalence de pathogènes humains dans les sols français, effet des facteurs pédoclimatiques, biologiques et du mode d'utilisation des sols. Thèse de doctorat, écologie microbienne, Université de Bourgogne, France, 188 p.
- 216- **Longaga, A., Vercruysse, A., et Foriers, A. (2000).** Contribution to the ethnobotanical, phytochemical and pharmacological studies of traditionally used medicinal plants in the treatment of dysentery and diarrhea in Lomola area, Democratic Republic of Congo. *J. Ethnopharmacol*, 71, 411-423.
- 217- **Logan, N. A., et Rodriguez-Diaz, M. (2006).** *Bacillus spp.* and Related Genera. In: *Principles and Practice of Clinical Bacteriology*. Eds. H. Gillespie & P. M. Hawkey, England, UK, 605 p.
- 218- **Low, J. C., et Donachie, W. (1997).** A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. *Vet J*, 153, 9 - 29.
- 219- **Luque de Castro, M. D., Jimenez, C. M. M., et Fernandez, P (1999).** Towards more rational techniques for the isolation of valuable essential oils from plants. *Trends in Analytical Chemistry*, 18 (11), 708-716.
- 220- **Lyautey, E., Lapen, D. R., Wilkes, G., McCleary, K., Pagotto, F., Tyler, K., Hartmann, A., Piveteau, P., Rieu, A. I., Robertson, W. J., Medeiros, D. T., Edge, T. A., Gannon, V., et Topp, E. (2007).** Distribution and characteristics of *Listeria monocytogenes*

- isolates from surface waters of the south nation river watershed, Ontario, Canada. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 5401-5410.
- 221- **Mabry, T. J., Markham, K. R., et Thomas, M. B. (1970).** The Systematic Identification of Flavonoids, Ed. Springer-Verlag Publication, New York, 354 p.
- 222- **Mahajan-Miklos, S., Tan, M. W., Rahme, L. G., et Ausubel, F. M. (1999).** Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell*, 96, 47-56.
- 223- **Maire, (1933).** Études sur la flore et la végétation du Sahara central. Mémoire de la société d'histoire naturelle de l'Afrique du nord. Ed. Mission du Hoggar, Alger, 272 p.
- 224- **Maiza, K., Hammiche, V, Bounaga, N., et Brac de la Perrière, R.A. (1992).** Inventaire des plantes médicinales de trois régions d'Algérie. Actes du Colloque International hommage à Jean Pernès: Complexes d'espèces, flux de gènes, ressources génétiques des plantes. Paris, pp. 631–633.
- 225- **Mallmann, W. L., et Litsky, W. (1951).** Survival of selected enteric organisms in various types of soil. *American Journal of Public Health and the Nations Health*, 41, 38-44.
- 226- **Marchal, N., Bourdon, J., Richard, C. L. (1991).** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Ed. Doin éditeurs, Paris, 482 p .
- 227- **Marfak, A. (2003).** Radiolyse Gamma des flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation de depsides. Thèse de doctorat, biophysique, Université de Limoges, faculté de pharmacie, France, 220 p.
- 228- **Markham, K. R., Ternai, B., Stanley, R., Geiger, H., et Mabry, T. J. C. (1982).** NMR Studies of Flavonoids II. *Tetrahedron*, 34, 1391–1397.
- 229- **Martin, M., Marhuenda, E., Perez-Guerrero, C., et Franco, J. M. (1994).** Antiulcer effect of naringin on gastric lesions induced by ethanol in rats. *Pharmacology*, 49, 144-150.
- 230- **Martinez, C., Pons, E., Prats, G., et Leon, J. (2004).** Salicylic acid regulates flowering time and links defense responses and reproductive development. *Plant J*, 37, 209-217.
- 231- **Mavar, M. H., Brick, D., Marie, D. E. P., et Quetin-Leclercq, J. (2004).** In vivo anti-inflammatory activity of *Alchornea cordifolia* (Schumach. & Thonn.) (Euphorbiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 92 (3), 209-214.

- 232- **Mazoir, N., Benharref, A., Bailèn, M., Reina, M., et Onzalezcoloma, A. (2008).** Bioactive triterpene derivatives from latex of two Euphorbia species. *Phytochemistry*, 69, 1328–1338.
- 233- **McLaughlin, H., Casey, P., Cotter, J., Gahan, C., et Hill, C. (2011).** Factors affecting survival of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in soil samples. *Archives of Microbiology*, 193, 775-785.
- 234- **Mawdsley, J. L., Bardgett, R. D., Merry, R. J., Pain, B. F., et Theodorou, M. K. (1995).** Pathogens in livestock waste, their potential for movement through soil and environmental pollution. *Applied Soil Ecology*, 2, 1-15.
- 235- **Middleton, E., Kandaswami, C., et Theoharides, T. C. (2000).** The effects of plants flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*, 52, 673-751.
- 236- **Monaghan, J. M., et Hutchison, M. L. (2012).** Distribution and decline of human pathogenic bacteria in soil after application in irrigation water and the potential for soil-splash-mediated dispersal onto fresh produce. *Journal of Applied Microbiology*, 112, 1007-1019.
- 237- **Moreira, M. R., Ponce, A. G., Del Valle, C. E., et Roura, S. I. (2005).** Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *Food sci. Technol*, 38(5), 565-570.
- 238- **Morreel, K., Goeminne, G., Storme, V., Sterck, L., Ralph, J., Coppieters, W., Breyne, P., Steenackers, M., Georges, M., Messens, E., et Boerjan, W. (2006).** Genetical metabolomics of flavonoid biosynthesis in *Populus*: a case study. *Plant J*, 47, 224-37.
- 239- **Moussaid, M., Elamrani, A.A., Bourhim, N. Et Benaissa, M. (2012).** Bulbes d'*Androcymbium gramineum* (Cav.) J.F.MACBR. (Colchicaceae): composition chimique, étude pharmacologique et toxicologique chez les souris. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 81, 90 – 100.
- 240- **Mubiru, D. N., Coyne, M. S., et Grove, J. H. (2000).** Mortality of *Escherichia coli* O157: H7 in two soils with different physical and chemical properties. *Journal of Environmental Quality*, 29, 1821-1825.
- 241- **Mucohata, Y., Nakabayashi, S., et Higashida, M. (1978).** Quercetin, an energy transfer inhibitor in photophosphorylation. *FEBS Lett*, 85, 215-218.
- 242- **Mundt, J. O. (1961).** Occurrence of Enterococci: bud, blossom, and soil studies. *Applied microbiology*, 9, 541-544.

- 243- Murray, B. E. (1990). The life and times of the Enterococcus. *Clinical microbiology reviews*, 3, 46-65.
- 244- Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Landry, M. L., et Pfaller, M. A. (2007). *Manual of Clinical Microbiology*, Ed. American Society of Microbiology Press, U.S.A, 153 p.
- 245- Müller, H. E. (1990). Listeria isolations from feces of patients with diarrhea and from healthy food handlers. *Infection*, 18, 97-100.
- 246- Nadkarni, K. M. (1982). Indian materis medica. Ed. City publishers, Inde, 948 p.
- 247- Namgoong, S. Y., Son, K. H., Chang, H. W., Kang, S. S., Kim, H. P. (1994). Effects of naturally occurring flavonoids on mitogen-induced lymphocyte proliferation and mixed lymphocyte culture. *Life sci*, 54 (5), 313-320.
- 248- Natarajan, K., Kumaresan, V., et Narayanan, K. (2005). A check list of Indian agarics and boletes (1984-2002). *Kavaka*, 33, 61-128.
- 249- Natvig, E. E., Ingham, S. C., Ingham, B. H., Cooperband, L. R., et Roper, T. R. (2002). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli* contamination of root and leaf vegetables grown in soils with incorporated bovine manure. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 2737-2744.
- 250- Nicholson, F. A., Groves, S. J., et Chambers, B. J. (2005). Pathogen survival during livestock manure storage and following land application. *Bioresource Technology*, 96, 135-143.
- 251- Nicoli, M. C., Anese, M., et Parpinel, M. (1999). Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. *J. Trends Food Sci. Technol*, 10, 94-100.
- 252- Nightingale, K. K., Schukken, Y. H., Nightingale, C. R., Fortes, E. D., Ho, A. J., Her, Z., Grohn, Y. T., McDonough, P. L., et Wiedmann, M. (2004). Ecology and transmission of *Listeria monocytogenes* infecting ruminants and in the farm environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 4458-4467.
- 253- Noble, C. J. (1978). Carriage of group D streptococci in the human bowel. *Journal of clinical pathology*, 31, 1182-1186.
- 254- Noble, R. T., Griffith, J. F., Blackwood, A. D., Fuhrman, J. A., Gregory, J. B., Hernandez, X., Liang, X., Bera, A. A., et Schiff, K. (2006). Multitiered approach using quantitative PCR to track sources of fecal pollution affecting Santa Monica Bay, California. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 1604-1612.

- 255- **Norhanom, A.W., et Yadav, M. (1995).** Tumour promoter activity in Malaysian Euphorbiaceae. *British Journal of Cancer*, 71: 776-779.
- 256- **Nyberg, K. A., Vinneras, B., Ottoson, J. R., Aronsson, P., et Albiñ, A. (2010).** Inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella Typhimurium* in manure-amended soils studied in outdoor lysimeters. *Applied Soil Ecology*, 46, 398-404.
- 257- **O'Hara, C. M., Brenner, F. W., Miller, J. M. (2000).** Classification, Identification, and Clinical significance of *Proteus*, *Providencia* and *Morganella*. *Clin Microbiol Rev*, 13(4), 534-46.
- 258- **Ohemeng, K. A., Schwender, C. F., Fu K. P., et Barrett J. F. (1993).** DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones (1) Bioorg. *Medicinal Chemistry Letters*, 3, 225–230.
- 259- **ONS. (2008).** Données du recensement général de la population et de l'habitat de 2008: repartition de la population résidente des ménages ordinaires et collectives, selon la commune de résidence et la dispersion, wilaya de Ghardaia (ONS).
- 260- **Oussou, K. (2009).** Etude chimique et activités biologiques des huiles essentielles de sept plantes aromatiques de la pharmacopée Ivoirienne. Thèse de Doctorat, phytochimie, Université de Cocody-Abidjan, Côte d'Ivoire, 241 p.
- 261- **Ozenda, P. (1991).** Flore et végétation du Sahara. Ed. CNRS, Paris, p.662.
- 262- **Ozenda, P. (1983).** Flore du Sahara. Ed, CNRS, Paris, 626 p.
- 263- **O'Connor, D. R. (2002).** Part one: a summary: report of the Walkerton Inquiry: the events of May 2000 and related issues. Ed, Ministry of the Attorney General, Toronto, 35 p.
- 264- **Paillard, D., Dubois, V., Thiebaut, R., Nathier, F., Hoogland, E., Caumette, P., et Quentin, C. (2005).** Occurrence of *Listeria spp.* in effluents of french urban wastewater treatment plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 7562-7566.
- 265- **Palici, I. F., Liktör-Busa, E., Zupko, I., Touzard, B., Chaieb, M., Urban, E., et Hohmann, J. (2015).** Study of in vitro antimicrobial and antiproliferative activities of selected Saharan plants. *Acta Biologica Hungarica*, 66(4), 385-394.
- 266- **Paris R., et Nothis A. (1978).** Plantes médicinales, phytothérapie. Ed. Masson, Paris, 339 p.
- 267- **Patni, N. K., Toxopeus, H. R., et Jui, P. Y. (1985).** Bacterial quality of runoff from manured and non-manured cropland. *Transactions of American Society of Agricultural Engineers*, 28, 1871-1877.

- 268- **Pelletier, L. L. (1996).** Microbiology of the Circulatory System in: Baron's Medical Microbiology. Ed. Baron S et al. Univ of Texas Medical Branch.
- 269- **Pibiri, M. C., Seigniez, C. et Roulet, C. A. (2001).** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles et leurs effets sur le bien-être des occupants. *CISBAT*, Lausanne, LESO, EPFL.
- 270- **Piochon, M. (2008).** Etude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore Laurentienne composition chimique, activité pharmacologiques et hémi-synthèse. Métrise, ressources renouvelables, Université du Québec à Chicoutimi, Canada, 200 p.
- 271- **Plésiat, P. (2011).** Résistance aux Antibiotiques des Espèces du Complexe *Burkholderia cepacia*. Université UFR SMP Besançon, France, 20 p.
- 272- **Quenzel, P., et Santa, S. (1963).** Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed. CNRS, Paris, 1170 p.
- 273- **Raaijmakers, J. M., Timothy, C. P., Steinberg, C., Alabouvette, C., Moënnelocoz, Y. (2009).** The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant Soil*, 321(1), 341- 361.
- 274- **Rahme, L., Stevens, E., Wolfort, S., Shao, J., Tompkins, R., et Ausubel, F. M. (1995).** Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science*, 268,1899-1902.
- 275- **Ran, Q., Badgley, B. D., Dillon, N., Dunny, G. M., Sadowsky, M. J. (2013).** Occurrence, genetic diversity, and persistence of Enterococci in a lake superior watershed. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(9), 3067–3075.
- 276- **Ramdani, R., Bouguessa, N., et Rahal, K. (2000).** Neonatal listeriosis in Algeria : the first two cases. *Clinical Microbiology and Infection*, 6 (3), 108-111.
- 277- **Reddy, K. R., Khaleel, R., et Overcash, M. R. (1981).** Behavior and transport of microbial pathogens and indicator organisms in soils treated with organic wastes. *Journal of Environmental Quality*, 10, 255-266.
- 278- **Reis, A. L. S., Montanhini, M. T. M., Bittencourt, J. V. M., Destro, M. T et Bersot1, L. S.(2014).** Gene detection and toxin production evaluation of hemolysin BL of *Bacillus cereus* isolated from milk and dairy products marketed in Brazil. *Braz J Microbiol*, 44(4),1195–1198.
- 279- **Ren, W., Qiao, Z., Wang, H., Zhu, L., et Zhang, L. (2003).** Flavonoids : Promising anticancer agents. *Medicinal research reviews*, 23 (4), 519-539.

- 280- **Reuther, J. W. A., et Noble, W. C. (1993).** An Ecological Niche for *Staphylococcus saprophyticus*. *Microbial Ecology in Health and Dis*, 6, 209-212.
- 281- **Reza Jassbi, A. (2006).** Chemistry and biological activity of secondary metabolites in *Euphorbia* from Iran. *Phytochemistry*, 67 (18), 1977-1984.
- 282- **Reeves, M, W., Evins, G, M., Heiba, A, A., Plikaytis, B, D., Farmer & J, J. (1989).** Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other Salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. *J Clin Microbiol*, 27(2), 313-20.
- 283- **Rhayour, K. (2002).** Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *E.coli*, *Bacillus Subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*. Thèse de doctorat, microbiologie appliquée, Faculté des sciences DharMehraz – Fés, Maroc, 170p.
- 284- **Richard, G. M. Olde, R., Herman, W., Barkema, S. V., Doris, E., Poole, R., Dingwell, T., et Gregory, P. K. (2006).** Prevalence of contagious mastitis pathogens in bulk tank milk in Prince Edward Island. *Can Vet J*, 47(6), 567–572.
- 285- **Rincé, A., Giard, J. C., Pichereau, V., Flahaut, S., et Auffray, Y. (2001).** Identification and characterization of *ofgsp65*, an organic hydroperoxide resistance (*ohr*) gene encoding a general stress protein in *Enterococcus faecalis*. *Journal of bacteriology*, 183, 1482-1488.
- 286- **Ribéreau-Guyon, P. (1968).** Les composés phénoliques des végétaux. Ed. Dunond, Paris, 189 p.
- 287- **Rocourt, J. (1988).** Taxonomy of the genus *Listeria*. *Infection*. 16, S89-S91.
- 288- **Rocourt, J. (1999).** The genus *Listeria*, *Listeria monocytogenes* : Phylogenetic position, taxonomy and identification. In: *Listeria, Listeriosis and food safety*. Eds. E. T. Ryser & E. H. Marth, New York, 896 p.
- 289- **Rossi, D., Bruni, R., Biachi, N., Chiarabelli, C., Gambari, R., Medici, A., Lista, A., et Paganetto, G. (2003).** Evaluation of mutagenic, antimutagenic and antiproliferative potential of *Croton lechleri* (Muell. Arg.) latex. *Phytomed*, 10, 139-144.
- 290- **Rosovitz, M. J., Voskuil, M. I., et Chambliss, G. H. (1998).** *Bacillus*. In: *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infection : Systematic Bacteriology*, Eds. L. Collier, A. Balows, M. Sussman, A. Balows & B. I. Duerden, USA, 1501 p.

- 291- Russo, T. A., et Johnson, J. R. (2000). Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *Journal of Infectious Diseases*, 181, 1753-1754.
- 292- Sagdic, O., et Ozcan, M. (2003). Antibacterial activity of Turkish spice hydrosols. *Food Control*, 14(3), 141-143.
- 293- Sandeep, P., Paarakh, M., et Gavani, U. (2009). Anthelmintic activity of *Jasminum grandiflorum* Linn leaves. *Pharmacologyonline*, 1, 153-156.
- 294- Sato, M., Tsuchiya, H., Miyazaki, T., Fujiwara, S., Yamaguchi, R., Kureshiro, H., et Iinuma, M. (1996). Antibacterial activity of hydroxychalcone against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 6, 227-231.
- 295- Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M. A., Roy, S. L., Jones, J. L., et Griffin, P. M. (2011). Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens. *Emerging infectious diseases*, 17, 7.
- 296- Scherer, C. A., et Miller, S. I. (2001). Molecular pathogenesis of salmonellae. In: Principles of bacterial pathogenesis. Eds. Academic Press, U.S.A, 826 p.
- 297- Sercu, B., Werfhorst, L. C. V. D., Murray, J., et Holden, P. A. (2008). Storm drains are sources of human fecal pollution during dry weather in three urban southern California watersheds. *Environmental science & technology*, 43, 293-298.
- 298- Semenov, A. V., van Overbeek, L., et van Bruggen, A. H. C. (2009). Percolation and survival of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in soil amended with contaminated dairy manure or slurry. *Applied and environmental microbiology*, 75, 3206-3215.
- 299- Shannon, K. E., Lee, D. Y., Trevors, J. T., et Beaudette, L. A. (2007). Application of real-time quantitative PCR for the detection of selected bacterial pathogens during municipal wastewater treatment. *Science of the total environment*, 382, 121-129.
- 300- Shapiro, S., Meier, A., et Guggenheim, B. (1994). The antimicrobial activity of essential oils and essential oil components towards oral bacteria. *Oral Microbiology Immunology*, 9, 202 - 208.
- 301- Shapiro, R., Hatheway, C., Becher, J., et Swerdlow, D. L. (1997). Botulism surveillance and emergency response: a public health strategy for a global challenge. *JAMA*, 278, 433-435.

- 302- Shunying, Z., Yang, Y., Huaidong, Y., Yue, Y., et Guolin, Z. (2005). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Chrysanthemum indicum*. *J of Ethnopharmacology*, 96, 151 - 158.
- 303- Sidorenko, M. L., Buzoleva, L. S., et Kostenkov, N. M. (2006). The effect of soil properties on the preservation and reproduction of *Listeria* and *Yersinia*. *Eurasian Soil Science*, 39, 211-217.
- 304- Singla, A.K., et Pathak, K., 1990-Phytoconstituents of *Euphorbia* species. *Fitoterapia*, LXI (6), 483-516.
- 305- Sindic, C. (2002). Neuro-infectiologie. Ed. Wolters Kluwer, France, 391 p.
- 306- Sipailiene, A., Venskutonis, P. R., Baranauskiene, R. et Sarkinas, A. (2006). Antimicrobial activity of commercial samples of thyme and marjoram oils. *Journal of Essential Oil Research*, 18, 698-703.
- 307- Smara, O., Julia, A., Moral-Salmi, C., Vigor, C., Vercauteren, J., et Legseir, B. (2014). Flavonoïds from *Euphorbia guyoniana* Boissier & Reuter. *J. Life Sci*, 8(6), 544-551.
- 308- Smara, O. (2014). Etude ethnobotanique et chimique d'*Euphorbia guyoniana* Boissier & Reuter. Thèse de doctorat, phytochimie, Faculté des sciences, Université BADJI MOKHTAR Annaba, Algérie, 215 p.
- 309- Smith, L. D. S. (1978). The occurrence of *Clostridium botulinum* and *Clostridium tetani* in the soil of the United States. *Health laboratory science*, 15, 74.
- 310- Smith, L. D. S. (1979). *Clostridium botulinum*: Characteristics and occurrence. *Review of Infectious Diseases*, 1, 637-641.
- 311- Smith, E. F., et Townsend, C. O. (1907). APLANT-TUMOR OF BACTERIAL ORIGIN. *Science*, 25(643), 6713.
- 312- Solbi S, (2013). Effet du repiquage de *Pseudomonas aeruginosa* sur les caractères morphologiques, biochimiques et sensibilité aux antibiotiques. Thèse de doctorat, pharmacie, Université Mohammed V Souissi, Rabat, Maroc, 116 p.
- 313- Solo-Gabriele, H. M., Wolfert, M. A., Desmarais, T. R., et Palmer, C. J. (2000). Sources of *Escherichia coli* in a coastal subtropical environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 230-237.
- 314- Solomon, E. B., Yaron, S., et Matthews, K. R. (2002). Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 397-400.

- 315- **Soma Oubougoué, B. (2002).** Activité antibactérienne d'extraits d'*Euphorbia hirta* (Linn), une plante utilisée traditionnellement dans le traitement des infections urinaires. Thèse de doctorat, pharmacie, Université de Ouagadougou, Burkina-Faso, 110 p.
- 316- **Spichigera, R. E., Savolainen, V. V., et Figeat, M. (2000).** Botanique systématique des plantes à fleurs. Ed. Presse polytechniques et universitaires Romandes, Lausanne, 372 p.
- 317- **Suarez, A., Blanco, Z., Delle Monache, F., Compagnone, R., et Arvelo, F. (2004).** Three new glutarimide alkaloids from *Croton cuneatus*. *Nat. Prod. Res*, 18, 421-426.
- 318- **Sylvestre, M., Legault, J., Dufour, D., et Pichette, A. (2005).** Chemical composition and anticancer activity of leaf essential oil of *Myrica gale* L. *Phytomedicine*, 12, 299-304.
- 319- **Tate, R. L. (1978).** Cultural and environmental factors affecting the longevity of *Escherichia coli* in histosols. *Applied and Environmental Microbiology*, 35, 925-929.
- 320- **Tapas, A. R., Sakarkar, D. M. et Kakde, R. B. (2008).** Flavonoids as nutraceuticals. *Topical journal of pharmaceutical research*, 7 (3), 1089-1099.
- 321- **Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., et Denamur, E. (2010).** The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 207-217.
- 322- **Ticknor, L. O., Kolsto, A. B., Hill, K. K., Keim, P., Laker, M. T., Tonks, M., et Jackson, P. J. (2001).** Fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis of Norwegian *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* soil isolates. *Applied and environmental microbiology*, 67, 4863-4873.
- 323- **Tieppo, J., Vercelino, R., Dias, A. S., Silva Vaz, M. F., Silveira, T. R., Marroni, C. A., Marroni, N. P., Henriques, J. A. P., et Picada, J. N. (2007).** Evaluation of the protective effects of quercetin in the hepatopulmonary syndrome. *Food and Chemical Toxicology*, 45, 1140-1146.
- 324- **Thiago, S., João, B., Fabíola, F., Adriana, R., et José, G. (2013).** Chemical composition, antibacterial and antibiotic modulatory effect of Croton. *Industrial Crops and Products*, 44, 630- 633.
- 325- **Tindall, B. J., Grimont, P. A. D., Garrity, G. M., et Euzéby, J. P. (2005).** Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 521-524.
- 326- **Tona, L., Kambu, K., Ngimbi, N., Cimanga, K., et Vlietinck A. J. (1998).** Antiamoebic and phytochemical screening of some Congolese medicinal plants. *J. Ethnopharmacol*, 61 (1), 57-65.

- 327- Tramier, R. (1986): Pathogens from land-based sources; Means of intervention and biocenosis. – OEPP Bull 16(2): 299-310.
- 328- Tschape, H., Prager, R., Streckel, W., Fruth, A., Tietze, E., et Bohme, G. (1995). Verotoxinogenic *Citrobacter freundii* associated with severe gastroenteritis and cases of haemolytic uraemic syndrome in a nursery school: green butter as the infection source. *Epidemiology and Infection*, 114(3), 441-450.
- 329- Tsimogiannis, D. I., et Oreopoulou, V. (2006). The contribution of flavonoid C-ring on DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3', 4'-hydroxy substituted members. *Innovat Food Sci Emerg Tech*, 7, 140-146.
- 330- Tyrrel, S. F., et Quinton, J. N. (2003). Overland flow transport of pathogens from agricultural land receiving faecal wastes. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 87-93.
- 331- Tripathi, R. D. et Tiwari, K. P. (1980). Geniculatin, a triterpenoid saponin from *Euphorbia geniculata*. *Phytochemistry*, 19 (10), 2163-2166.
- 332- Turkmen, N., Velioglu, Y. S, Sari, F., et Polat, G. (2007). Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea. *Molecules*, 12(3), 484-496.
- 333- Ukwe, C.V. (1997). Antiulcer activity of aqueous stem bark extract of *Hymenocardia acida* TUL (Euphorbiaceae). *Int. J. Pharmacogn*, 35, 354-357.
- 334- Ultee, A., Kets, E. P. W., et Smid, E. J. (1999). Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen. *Appl. Environ. Microbiol*, 65, 4606–4610.
- 335- Ultee, A., Kets, E. P. W., Alberda, M., Hoekstra, F. A., et Smid, E. J. (2000). Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Arch. Microbiol*, 174, 233–238.
- 336- Ultee, A., Bennik, M. H. J., et Moezelaar, R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol*, 68, 1561–1568.
- 337- Unc, A., et Goss, M. J. (2003). Movement of faecal bacteria through the vadose zone. *Water, Air, and Soil Pollution*, 149, 327-337.
- 338- USEPA, (2004). Water quality standards for coastal and great Lakes recreation waters. *Environmental Protection Agency*, 67218-67243.
- 339- Vaaje-Kolstad, G et al. (2010). An Oxidative Enzyme Boosting the Enzymatic Conversion of Recalcitrant Polysaccharides . *Science*, 330 (6001), 219–222.

- 340- Van Bruggen, A. H. C., Semenov, A. M., van Diepeningen, A. D., de Vos, O. J., et Blok, W. J. (2006). Relation between soil health, wave-like fluctuations in microbial populations, and soil-borne plant disease management. *European journal of plant pathology*, 115, 105-122.
- 341- Van Elsas, J. D., Chiurazzi, M., Mallon, C. A., Elhottova, D., Kristufek, V. C., et Salles, J. F. O. (2012). Microbial diversity determines the invasion of soil by a bacterial pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 1159-1164.
- 342- Vanrenterghem, B., Huysman, F., Rygole, R., et Verstraete, W. (1991). Detection and prevalence of *Listeria monocytogenes* in the agricultural ecosystem. *Journal of Applied Bacteriology*, 71, 211-217.
- 343- Valenzuela, E., Collyer, D., Armentano, G.B., Parsons, F.A., et Court, C. (2012). Hetz Activation of the unfolded protein response enhances motor recovery after spinal cord injury. *Cell Death Dis*, 3, 272.
- 344- Vazquez-Boland, J. A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W., Gonzalez-Zorn, B., Wehland, J., et Kreft, J. (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews*, 14, 584-640.
- 345- Velge, P., Cloeckaert, A., Barrow, P. (2005). Emergence of *Salmonella* epidemics : The problems related to *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. *Veterinary Research*, 36, 267-288.
- 346- Verhoeven, M. E., Bovy, A., Collins, G., Muir, S., Robinson, S., de Vos, C. H. R., Colliver, S. (2002). Increasing antioxidant levels in tomatoes through modification of the flavonoid biosynthetic pathway. *Journal of Experimental Botany*, 53, 2099-2106.
- 347- Vilain, S., Luo, Y., Hildreth, M., et Brozel, V. (2006). Analysis of the Life Cycle of the Soil Saprophyte *Bacillus cereus* in Liquid Soil Extract and in Soil. *Applied Environmental Microbiology*, 72(7), 4970-4977.
- 348- Walsh C. (2003). Antibiotics: actions, origins, resistance. Ed. ASM Press, Washington, 117 p.
- 349- Weis, J., et Seeliger, H. P. R. (1975). Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature. *Applied Microbiology*, 30, 29-32.
- 350- Welshimer, H. J. (1960). Survival of *Listeria monocytogenes* in soil. *Journal of Bacteriology*, 80, 316-320.
- 351- Welshimer, H. J. (1968). Isolation of *Listeria monocytogenes* from Vegetation. *Journal of Bacteriology*, 95, 300-303.

- 352- Welshimer, H. J., et Donker-Voet, J. (1971). *Listeria monocytogenes* in Nature. *Applied Microbiology*, 21, 516-519.
- 353- Welshimer, H. J. (1975). *Listeria* in nature. *Problems of listeriosis*, 59-60.
- 354- Wheeler, A. L., Hartel, P. G., Godfrey, D. G., Hill, J. L., et Segars, W. I. (2002). Potential of as a human fecal indicator for microbial source tracking. *Journal of Environmental Quality*, 31, 1286-1293.
- 355- Winfield, M. D., et Groisman, E. A. (2003). Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 3687-3694.
- 356- Yang, X., Wang, J., Ma, Y., Xiao, H., Zuo, Q., Lin, H., He, H., Li, L., et Hao X. (2007). Bioactive Phenols from the leaves of *Baccaurea ramiflora*. *Planta Med*, 73, 1415-1417.
- 357- Yao, L. H., Jiang, Y. M., Shi, J., Tomas-Barberan, F. A., Datta, N., Singanusong, R., et Chen, S. S. (2004). Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Food Hum Nutr*, 59, 113-122.
- 358- Yeom, J., Shin, J. H., Yang, J. Y., Kim, J., et Hwang, G. S. (2013). (1)H NMR-based metabolite profiling of planktonic and biofilm cells in *Acinetobacter baumannii* 1656-2. *PloS one*, 8(3), e57730.
- 359- Yeo Sounta, O., Guessennd Kouadio, N., Meité, S., Ouattara, K., Bahi Gnogbo, A., N'Guessan, J. D., et Coulibaly, A. (2014). In vitro antioxidant activity of extracts of the root *Cochlospermum planchonii* Hook. f. ex. Planch (Cochlospermaceae). *J Pharmacogn Phytochem*, 3(4), 164-170.
- 360- Youdim, K., McDonald, J., Kalt, W., et Joseph, J. A. (2002). Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults (small star, filled). *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 282-288.
- 361- You, Y., Rankin, S. C., Aceto, H. W., Benson, C. E., Toth, J. D., et Dou, Z. (2006). Survival of *Salmonella enterica* serovar Newport in manure and manure-amended soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 5777-5783.
- 362- Yu, F., Lian, X., Guo, H., McGuire, P., Li, R., Wang, R., et Yu, F. (2005). Isolation and characterization of methyl esters and derivatives from *Euphorbia kansui* (Euphorbiaceae) and their inhibitor effects on the human SGC-7901 cells. *J. Pharm. Sci*, 8, 528-535.

Références Bibliographiques

- 363- Zellagui, A., Said Noamane, L., Gherraf, N., et Rhouati, S., (2012).** Phytochemical screening of five Algerian plants and the assessment of the antibacterial activity of two *Euphorbia guyoniana* extracts. *Der Pharmacia Lettre*, 4(5), 1438-1444.
- 364- Zhai, Q., Coyne, M. S., et Barnhisel, R. I. (1995).** Mortality rates of fecal bacteria in subsoil amended with poultry manure. *Bioresource Technology*, 54, 165-169.

ANNEXES

Annexe 01: Fiches techniques des réactifs et solutions utilisés

Fiche technique 1 : chlorure de fer anhydre à 5%
FeCl ₃10g. L'eau distillée.....200g.
Fiche technique 2 : Hydroxyde de sodium à 20%
Hydroxyde de sodium.....20g. Eau distillée.....100ml.
Fiche technique 3 : Hydroxyde de potassium à 10 %
Hydroxyde de potassium....10g. Eau distillée.....100ml.
Fiche technique 5 : réactif de Drangendroff
Solution a : 0.85 g de nitrate de bismuth+ 40 ml d'eau distillée+ 10ml d'acide acétique. Solution b : 8g d'iode de potassium+ 2 ml d'eau distillée. On mélange a et b : 15 ml de mélange + 20 ml d'acide acétique puis compléter avec l'eau distillée.
Fiche technique 4 : réactif de Stiansy
2 volume de formol.....50ml. 1 volume de HCl 1N....25ml.
Fiche technique 6 : Eau physiologique
Sodium chloride.....9g. Eau distillée.....1000ml.

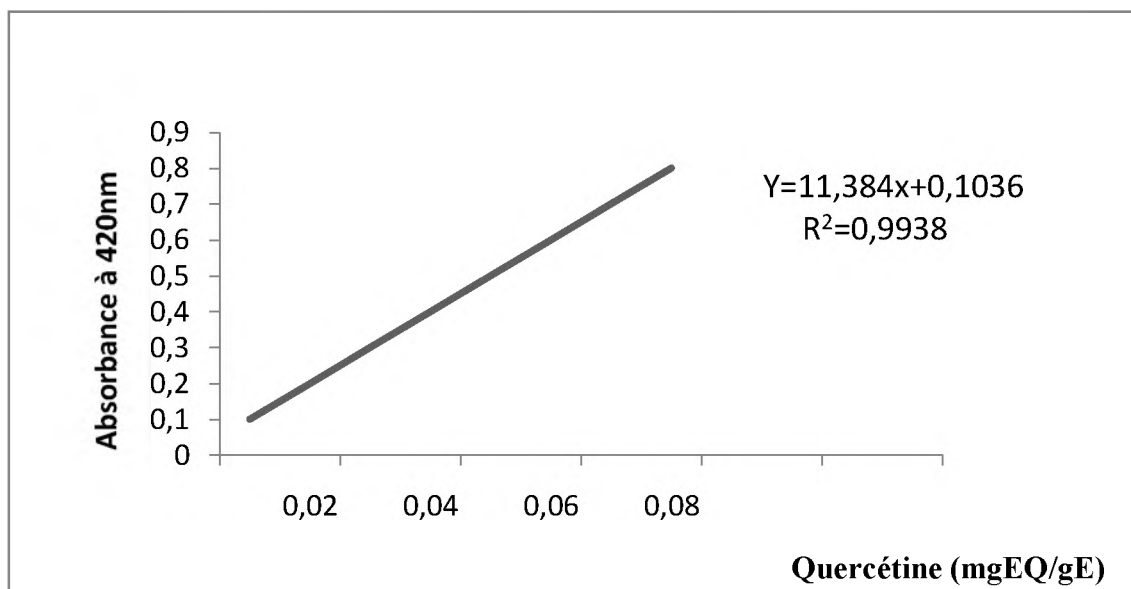
Annexe 02 : composition des milieux de culture

Milieu de culture	Composition
Gélose nutritive	Hydrolysate tryptique de caséine2,5g Extrait de viande5g Glucose1g Extrait de la levure 2,5g Agar15g Eau distillée q.s.p 1000 ml pH=7 à 37°C
Gélose Mueller-Hinton	Infusion de viande de bœuf..... 300ml Peptone de caséine.....17.5g Amidon de maïs.....1.5g Agar.....10.0g pH= 7.4

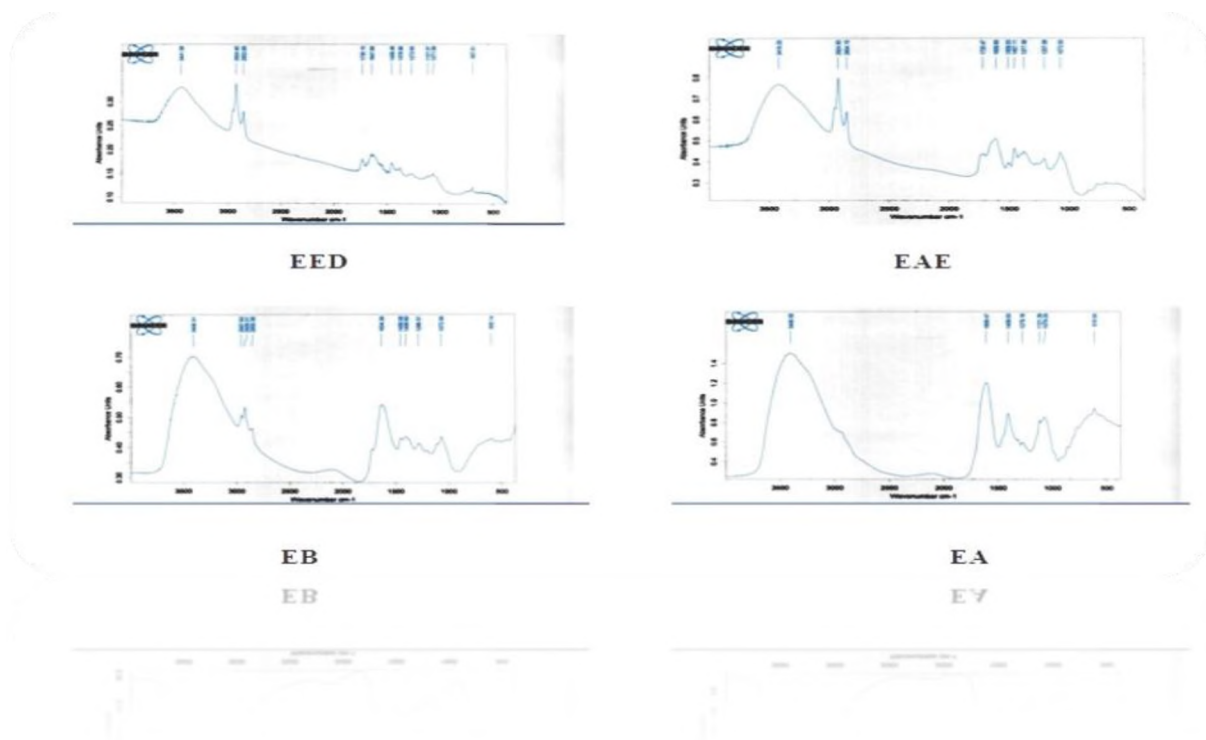
Annexe 03 : composition des milieux d'identification

milieux d'identification	Composition
TSI	Extrait de viande de bœuf3 g Extrait de levure 3 g Peptone20 g Chlorure de sodium 5 g Citrate ferrique 0,3 g Thiosulfate de sodium 0, 3 g Lactose10 g Glucose1 g Saccharose..... 10 g Rouge de phénol0,05 g Agar.....12 g Eau distillée q.s.p1000 ml pH=7,4
Clark et Lubs	Peptone tryptique ou poly peptone 5 – 7 g Glucose5 g Phosphate dipotassique5 g Eau distillée q.s.p1000 ml pH =7
Urée –Indole	L-tryptophane3 g KH ₂ PO ₄1 g K ₂ PO ₄1 g NaCl5 g Urée20 g Alcool à 95°10 ml Rouge de phénol à 1%2,5 ml Eau distillée q.s.p 1000 ml
Esculine	Polypeptone10g Extrait de levure 5g Acétate de sodium5g Tween 801 ml Mg SO ₄0.05g Mn SO ₄ 0.2 g Esculine5g Citrate de fer ammoniacal0.5 g pH = 6.5

Citrate de simmons	Chlorure de sodium.....5g
	Sulfate de magnésium $7\text{H}_2\text{O}$0.2g
	Phosphate di potassique $\text{PO}_4 \text{H}_2$2g
	Citrate trisodique.....2g
	Solution bleu de bromothymol 1%.....8ml
	Agar.....15g
	Eau distillé.....1000ml
	Ph = 7

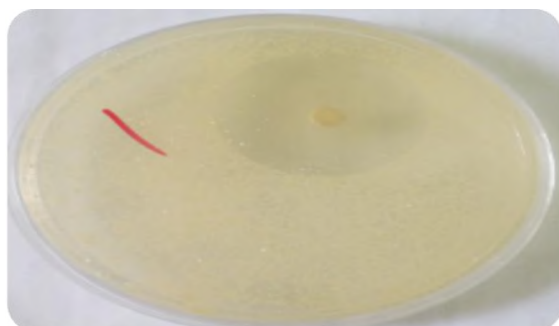
Annexe 04 : courbe étalon de la quercétine

Annexe 05 : spectre d'analyse par Infrarouge des extraits flavonoidiques d'*Euphorbia guyoniana*

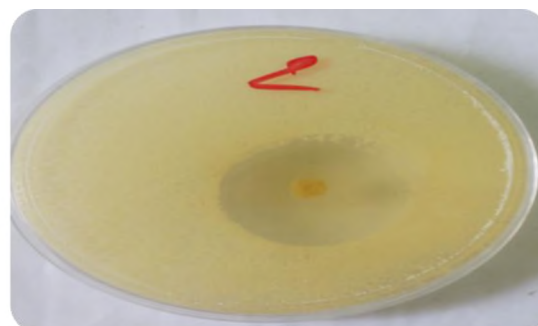


EA : extrait aqueux, EB : Extrait butanolique, EAE : Extrait d'acétate d'éthyle, EED : Extrait d'éther diéthylique

Annexe 06 : Tests de sensibilité à l'extrait aqueux flavonoidique d'*Euphorbia guyoniana*

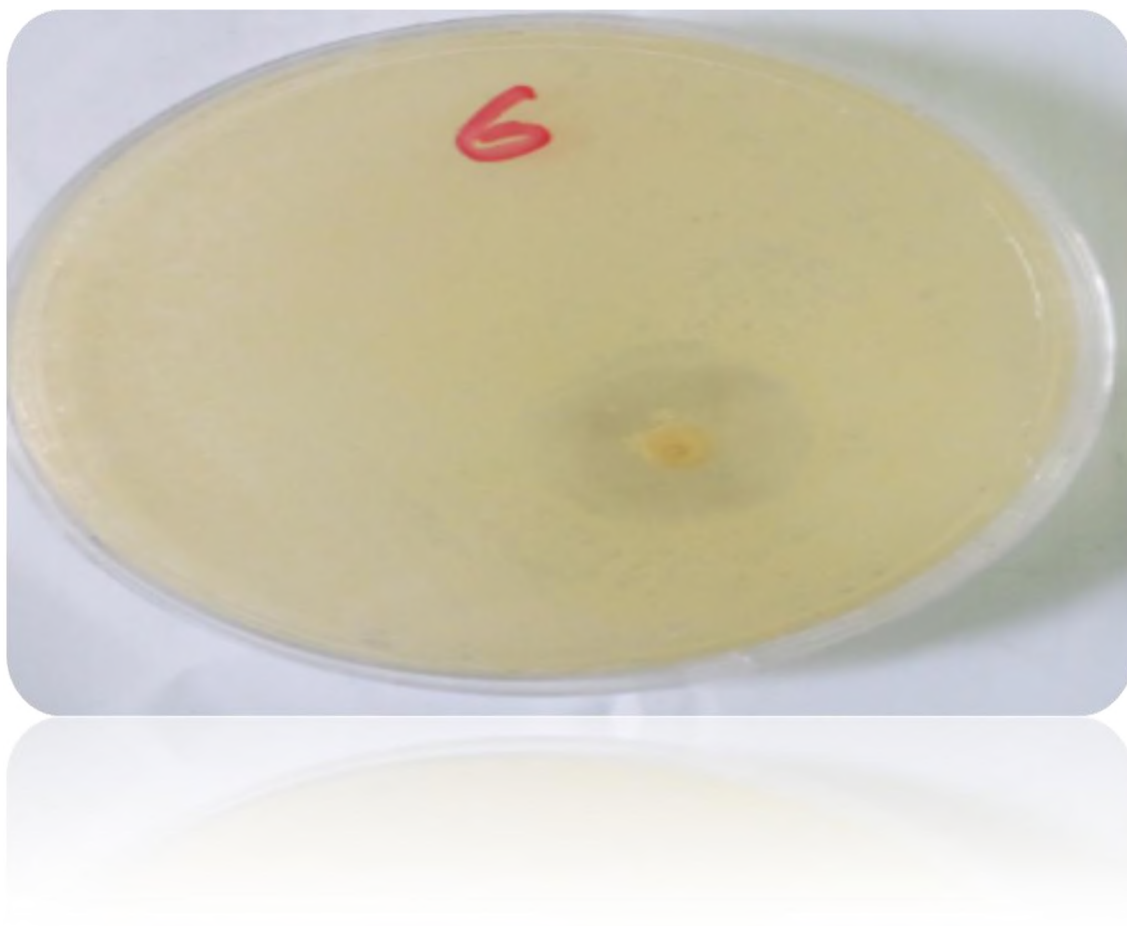


S. aureus



E. coli

Annexe 07 : Tests de sensibilité à l'huile essentielle d'*Euphorbia guyoniana*



E. coli

PUBLICATIONS

ET

COMMUNICATION

Liste des publications et communications

1- **BOUMAZA Sarah, BOUCHENAK Ouahida, YAHIAOUI Karima, ARAB Karim, (2017),** « Evaluation de l'effet des flavonoïdes *d'Euphorbia guyoniana* sur les bactéries pathogène du sol » 10- 11 Avril Naama.

2- **BOUMAZA Sarah, BOUCHENAK Ouahida, YAHIAOUI Karima, TOUBAL Souhayla, ARAB Karim, (2018),** « Screening phytochimique *d'Euphorbia guyoniana* Boiss. Et Reut. Et évaluation de son activité antimicrobienne contre les bactéries d'origine tellurique » 2- 3 Mai Khemis Miliana.

EFFECT OF THE AQUEOUS EXTRACT OF *EUPHORBIA GUYONIANA* (EUPHORBIACEAE) ON PATHOGENIC BACTERIA FROM LAND-BASED SOURCES

BOUMAZA, S.* – BOUCHENAK, O. – YAHIAOUI, K. – TOUBAL, S. – EL HADDAD, D. – ARAB, K.

Laboratory of Valorization and Conservation of Biological Resources (VALCOR), Department of Biology, Faculty of Sciences, University of M'hamed Bougara, 3500 Boumerdes, Algeria
(phone: +213-24-912-951; fax: ++213-24-912-951)

*Corresponding author

e-mail: sarah.boumaza1@hotmail.fr; phone: +213-66-531-4176; fax: +213-24-951-738

(Received ; accepted)

Abstract. *Euphorbia guyoniana* is a medicinal plant endemic to Algeria. It is used by local populations for its medicinal properties. This study was to determine the antibacterial effect of the aqueous extract from *Euphorbia guyoniana* on pathogenic bacteria of telluric origin. The aqueous extract was obtained by confrontation with organic solvents method with a yield of 1.7%. The total content of the flavonoid extract was evaluated by the method of Aluminum Trichloride and was found to be 0.31 mg EQ/gE. The extract obtained was characterized by Infrared Spectroscopy and revealed a richness of phenol, aldehyde and ester then analyzed by High-Performance Liquid Chromatography, which allowed us to identify 27 flavonoid compounds. The extract was tested by the diffusion method on agar, on 12 bacterial strains isolated from a henhouse and identified by VITEK. These strains seem to be sensitive to the flavonoids of *Euphorbia guyoniana* with MICs varying from 1.47 to 61.78 mg/ml. The order of sensitivity of the bacterial strains to the extract is represented in the following order: *Staphylococcus aureus* > *Streptococcus faecalis* > *Escherichia coli*. Thus, the flavonoids of *Euphorbia guyoniana* may be an alternative to chemical control of certain pathogenic microorganisms.

Keywords: *Euphorbia guyoniana*, flavonoids, antibacterial activity, HPLC, VITEK

Introduction

Within microbial communities in the soil, there may be some microorganisms that are pathogens for plants, animals and humans (Raaijmakers, 2009). Soil is a natural habitat that can contain some primary and opportunistic pathogenic bacteria. The rhizosphere may contain certain opportunistic bacteria such as *Burkholderia spp.*, *Ochrobactrum spp.* and *Stenotrophomonas spp.* (Berg et al., 2005). *Pseudomonas aeruginosa* is a highly encountered bacterium in the soil (Colinon et al., 2013). Some primary pathogenic bacteria are natural soil inhabitants, such as *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis*, which can cause serious diseases in humans (food poisoning and pneumonia) (Ticknor et al., 2001; Reis et al., 2014). Other bacteria are highly pathogenic to humans such as *Clostridium botulinum* and *Clostridium tetani* (Smith, 1978, 1979). There are certain categories of bacteria with a saprophyte life in soil such as *Listeria monocytogenes* (Freitag et al., 2009). The importance of these pathogens from land-based sources is growing with the increasing practice of monoculture, mainly in the Mediterranean regions (Tramier, 1986).

Control of pathogens from land-based sources has always been difficult, however the use of biocidal soil disinfection products such as chloropicrin and methyl bromide has been found to be very dangerous for humans and useful organisms' cultures. Fortunately, these products have been definitely banned, which does not solve the problem of the control of diseases of land-based origin. Vector control during epidemics

is achieved through chemical insecticides, but their use continues to give rise to a high level of contamination and ecological imbalance due to the appearance of resistance. This is why the World Health Organization (WHO) insists on the search for new methods of control that are basically biological.

Euphorbiaceae contains several families of chemical compounds such as alkaloids (De Nazare et al., 2005), flavonoids, Cyanogenetic compounds (Hunsa et al., 1995), ellagic acid (Mavar et al., 2004) Saponins (Tripathi and Tiwari, 1980) and terpenes (Mazoir et al., 2008). Among the species endemic to Algeria, *Euphorbia guyoniana* had a particular importance in the pharmacopoeia. According to Bellakhdar (1997), it is used by many Saharan populations against poisonous bites and stings and various infections. The latex of the plant is used to attack warts and to extirpate thorns.

This study attempts to establish for the first time the effect of the aqueous extract of a medicinal plant (*Euphorbia guyoniana*) on the human bacterial pathogen in the telluric environment for the purpose of biological control.

Materials and methods

Plant material

Experiments were carried out on the aerial and underground parts of *Euphorbia guyoniana*, collected from the Ghardaïa region (South Algeria) in February 2016. The botanical identification of the species was carried out at the botanical laboratory of the Higher National School of Agronomy (ENSA) in El-Harrach (Algeria). The whole plant (stems, flowers, leaves and roots) was used for the preparation of the extract. The plant material was ground after drying at ambient temperature in dark place in order to preserve the integrity of the molecules. The obtained ground product was stored in a hermetically sealed flask (*Photo 1*).



Photo 1. Aerial part of Euphorbia guyoniana

Extraction procedure

The extraction of flavonoids was carried out according to the Bruneton protocol (1999). The principle of this technique is based on the treatment of the plant material

with various solvents. It is based on the degree of solubility of flavonoids in organic solvents. The recovered aqueous extract was stored in the dark in hermetically sealed vials and subjected to chemical and biological analysis.

Colorimetric determination of the flavonoic extract

The content of *Euphorbia guyoniana* in flavonoids was determined by the method of Aluminum Trichloride (AlCl_3) cited by Bajorun et al. (1996); Djeridane et al. (2006) and Ayoola et al. (2008). This method is based on the formation of an aluminum flavonoid-ion complex having a maximum absorbance at 430 nm. The concentration of flavonoids was calculated from the calibration curve established with Quercetin and expressed in equivalent milligrams of Quercetin per gram of extract weight (mg EQ/gE).

Infrared spectroscopy analysis of the extract

The infrared spectrum of the aqueous extract, for a frequency range between 400 and 4000 cm^{-1} , was obtained by a NICOLET 560 type spectrometer.

High performance liquid chromatography (HPLC)

Qualitative analysis of the aqueous extract was realized using HPLC. The apparatus consisted of a Young Line YL9100 liquid phase chromatograph, equipped with a YL 9101 quaternary pump with integrated degasifier YL 9101, a UV/Visible detector YL 9120 and a YL 9131 oven. The column used was Agilent eclips XDB C 18 ($5\text{ }\mu\text{m}$) with a length of 25 cm and an internal diameter of 4.6 mm. The mobile phase was a mixture of ultrapure water / acetonitrile / acetic acid (50:47:2.5) in an isocratic system with a flow rate of 1 ml/min. The volume of extract and standards injected was 20 μl . The detection of the compounds was done with a UV detector at a wavelength of 280-320 nm.

Isolation and identification of pathogenic bacteria

The bacteria were isolated from the soil of a henhouse in the Bouira region (Algeria). Soil sampling was carried out by the suspension-dilution method described by Vidhyasekaran et al. (1997). The identification of bacteria was made by fresh macroscopic observation based on morphological criteria of the colony, microscopic observation including methylene blue staining and Gram staining, biochemical galleries and confirmed by VITEK.

Several bacterial strains have been identified in this soil, such as *E. coli* which is a commensal bacterium of the human digestive tract as well as of many animals. At a rate of 10^7 to 10^9 Colony Forming Unit (CFU) per gram of faeces, it accounts for 80-90% of the most dominant species of the aerobic bacterial flora of the human intestine (Tenaillon et al., 2010). These strains are both responsible for intestinal and extra-intestinal infections (urinary infections, bacteremias, meningitis ...) (Locatelli., 2013). It is mainly via the natural excretion of fecal matter by animals that these pathogenic bacteria have been introduced into aquifers, rivers and soil (Solo-Gabriele et al., 2000; An et al., 2002; Byappanahalli et al., 2006).

Enterococcus faecalis is also a commensal bacterium of the intestines of humans and warm-blooded animals. It is a species found in human excreta at concentrations ranging

from 10^5 to 10^7 per gram of faeces (Noble, 1978; Leclerc et al., 1996). It is also found in faeces of animals such as cattle, poultry, pigs and sheep, but to a lesser extent (Leclerc et al., 1996; Franz et al., 1999; Wheeler et al., 2001). This species is an opportunistic pathogen, affecting only individuals with weakened immune systems, particularly in hospitals (Morrison et al., 1997). It may cause endocarditis, bacteremia, meningitis, urinary tract infections, intraabdominal infections and surgical wound infections (Chenoweth and Schaberg., 1990; Jett et al., 1994). Because of its natural presence in the intestines and fecal matter of humans and animals, this bacterium is frequently found in soil and on plants (Mundt., 1961; Fujioka et al., 1998; Byappanahalli et al., 2012; Valenzuela et al., 2012; Ran et al., 2013).

Staphylococcus aureus is a ubiquitous bacterium that is found specifically on mucous membranes, the nasopharyngeal sphere and skin of warm-blooded animals and humans (Ostyn et al., 2012). Staphylococci producing coagulases are essentially represented by the species *Staphylococcus aureus*. In addition to food poisoning and nosocomial infections in humans, this species may cause clinical and subclinical mastitis in ruminants, particularly cows, which is a common reason for milk contamination (Ostyn et al., 2012).

Evaluation of the resistance of isolated bacteria to antibiotics

The resistance of the isolated bacteria was tested by synthetic antibiotics, using the Muller Hinton agar diffusion method. The antibiotics used are Erythromycin (E₁₅) (15 mcg) Ciproflaxacin (Cip₅) (5 mcg) Clindamycin (Cl₂₅) (25 mcg) Nalidixic Acid (Na₃₀) (30 mcg) and Carbenicillin (Cb₁₀₀) (100 mcg). Areas of inhibition were determined according to the recommendations of the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2006) and bacteria were classified as resistant or susceptible to antibiotics.

Evaluation of the antibacterial activity

The evaluation of the antibacterial activity of the aqueous extract of *Euphorbia guyoniana* was carried out by the diffusion method in agar medium recommended by several authors (Belaiche, 1979; Garbonnelle et al., 1987; Joffin and Leyral, 2014; Koba et al., 2004). Petri dishes containing the Muller Hinton agar were inoculated with a quantity of bacterial suspension (0.5 McFarland), according to the recommendations of the NCCLS. Sterilized paper discs of 6 mm of diameter, impregnated with 10 µL of extract were placed on the surface of agar. The plates were kept for 2 h at 4 °C and then incubated overnight at 37 °C. The sensitivity of the strain to the extract is manifested by the size of the diameter of the bacterial-free zone surrounding the disc. The antimicrobial activity was determined by measuring the Minimum Inhibitory Concentrations (MICs). Three replicates are performed for each bacterium.

Statistical analysis

The results were expressed as mean $\pm$ Standard Error of Mean (M $\pm$ ESM). The statistical analysis was performed using the Statistica software[®] (version 6, Genistat Conseils Inc., Montreal). After the analysis of the variance, the comparison of the averages is performed by the student's test for matched samples. The test is considered statistically significant when the value of p is ≤ 0.05 , for a confidence interval of 95%.

Results

Extraction yield on flavonoids

Aqueous extract containing flavonoids was obtained with a yield of flavonoids of 1.7%. The reason of using the aqueous extract for the study of the antibacterial activity in spite of its low rate is its richness in very polar flavonoids.

Colorimetric determination of flavonoids

The content in flavonoids is reported in equivalent mg of quercetin/g of the plant. The concentration of the flavonoid in the aqueous extract is 0.31 mg EQ/gE.

Infrared spectroscopy analysis of flavonoic extracts

The results of the infrared characterization of the aqueous extract are shown in the Table 1.

Table 1. Infrared analysis of the flavonoic extract

Wave length (cm ⁻¹)	Bonds	Nature of the bond	Function
3406.58	-OH free	Broad band	Phenol
1609.47	C=O	Mean band	Aldehyde
1079.29	C-O	Weak band	Ester

In the aqueous extract of *Euphorbia guyoniana*, and referring to the work of Mabry et al. (1970), the broad band around 3406.58 cm⁻¹ is associated with the elongation vibration of the OH bond (phenol function). The mean band at 1609.47 cm⁻¹ corresponds to the elongation vibration of the C=O bond (aldehyde function). Finally, a weak band of 1079.29 cm⁻¹ is associated with the elongation vibration of the C-O bond (ester function).

HPLC

The HPLC analysis revealed the presence of 41 compounds, of which 27 could be identified in the flavonoid extract of *Euphorbia guyoniana* (Fig. 1, Table 2).

Table 2. HPLC of the flavonoid extract of Euphorbia guyoniana

Number	R _T (Min)	%	Compound name
01	34.203	0.4	P-coumaric acid
02	46.703	1.0	Rosmarinic acid
03	62.753	2.0	Quercetin
04	17.237	9.5	Gallic acid
05	27.320	0.4	caffeic acid
06	41.137	0.3	Rutin
07	50.403	19.1	Ellagic acid
08	56.103	6.6	Myricetin
09	27.320	0.4	Syringic acid
10	37.903	0.2	Ferulic acid

Number	R _T (Min)	%	Compound name
11	64.670	4.0	Kaempferol
12	23.520	0.3	Proanthocyanidin dimer
13	41.137	0.3	Myricetin 3-O-glucoside
14	61.787	1.5	Amentoflavone
15	45.320	1.6	Isoferulic acid
16	47.953	2.5	Quercetin-3-β-Ogalactoside
17	49.470	1.5	Luteolin-7-β-Oglucoside
18	56.103	6.6	Quercetin-3-O-α-rhamnoside
19	73.337	1.5	Luteolin
20	10.187	4.4	Hydroxytyrosol
21	58.370	3.0	Apigenin-7-Oglucoside
22	54.737	4.7	Apigenin-7-Orutinoside
23	49.470	1.5	Luteolin-7-Oglucoside
24	23.520	0.3	Salicylic acid
25	43.053	0.3	Benzoic Acid
26	47.953	2.5	M-coumaric acid
27	58.370	3.0	O-coumaric acid

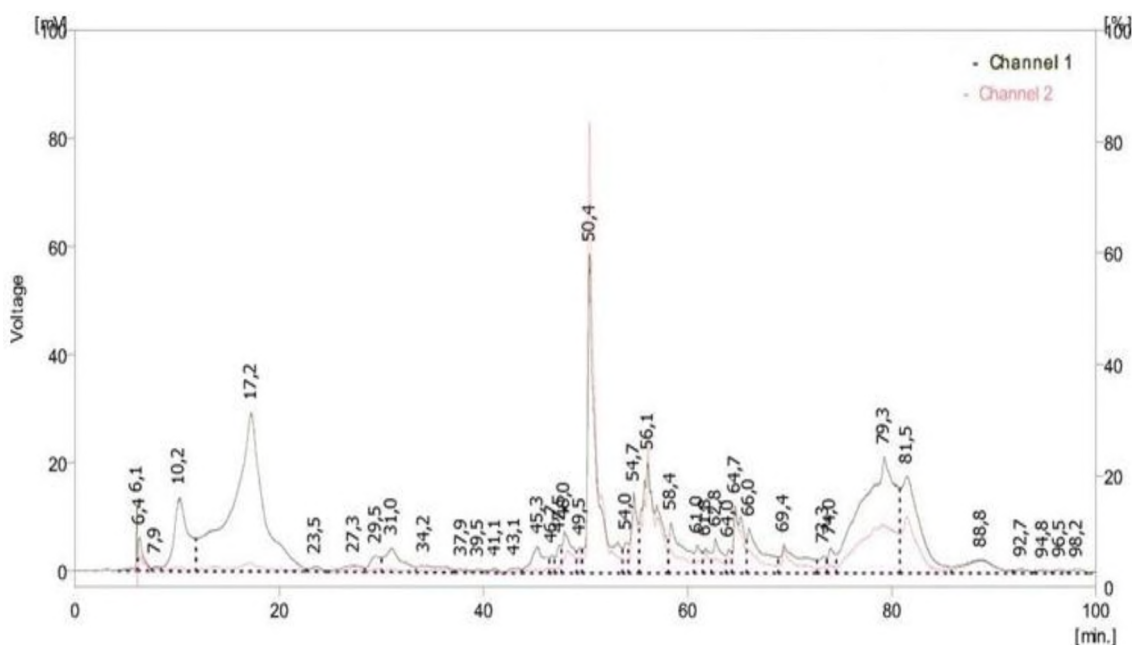


Figure 1. Chromatogram of HPLC applied to flavonoids

The analysis showed that the aqueous extract of *Euphorbia guyoniana* is rich in molecules with antibacterial activity. The major compounds are ellagic acid (19.1%), gallic acid (9.5%), Myricetine and Quercetin-3-O-α-rhamnoside (6.6%), Apigenin-7-Orutinoside (4.7%), Hydroxytyrosol (4.4%) and Kaempferol (4.0%), The other identified molecules are present at rates of less than 3%.

Identification of isolated bacteria

The results of the identification of isolated bacteria are shown in *Tables 3* and *4*.

In total, twelve bacterial strains are isolated and identified from a henhouse soil belonging to three species: *Escherichia coli* (Gram negative), *Staphylococcus aureus* (Gram positive) and *Enterococcus faecalis* (Gram positive).

Table 3. Identification of bacterial strains

Sample	Macroscopic appearance		Microscopic appearance		Culturing		Biochemical tests	
	Form	Size	Fresh state	Gram staining/ Grouping mode	Culture media	Conditions	Oxidase	Catalase
01	Very small colony Pink	1 mm	Cocci immobile	G + Bunch of grapes	CHAPMAN	24 h at 37 °C	-	+
02	Large colony Yellowish	3 mm	Bacillus mobile	G- Isolated	HEKTOEN	24 h at 37 °C	-	+
03	Large colony Orange	4 mm	Bacillus mobile	G- Diplocoque	HEKTOEN	24 h at 37 °C	-	+
04	Small colony Transparent	1.5 mm	Cocci immobile	G+ Chain	BEA	24 h at 37 °C	-	-
05	Large colony Salmon	3 mm	Bacillus mobile	G- Diplocoque	HEKTOEN	24 h at 37 °C	-	+
06	Large colony Yellowish	4 mm	Bacillus immobile	G- Clusters	HEKTOEN	24 h at 37 °C	-	+
07	Small colony Golden	1.5 mm	Cocci immobile	G+ Bunch of grapes	CHAPMAN	24 h at 37 °C	-	+
08	Very small colony Yellowish	0.5 mm	Cocci immobile	G+ Bunch of grapes Isolated	CHAPMAN	24 h at 37 °C	-	+
09	Small colony Whitish	1.5 mm	Cocci immobile	G+ Chain Diplocoque	BEA	24 h at 37 °C	-	-
10	small colony Yellowish	1.5 mm	Cocci immobile	G+ Bunch of grapes	CHAPMAN	24 h at 37 °C	-	+
11	Small colony Transparent Surrounded by a black halo	1.5 mm	Cocci immobile	G+ Chain Isolated	BEA	24 h at 37°C	-	-
12	Small colony transparent	0.5 mm	Cocci immobile	G+ Chain	BEA	24 h at 37°C	-	-

+: presence; -: absence; G+: Gram positive; G-: Gram negative

Table 4. Biochemical galleries

Sample	Biochemical galleries													Name of the germ
	NR	Mob	Gaz	Glu	Suc	Lac	H2S	Urease	Indol	CIT	LDC	ODC	ADH	
01	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	/	/	/	<i>Staphylococcus aureus</i> (Staphylococcaceae)
02	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	<i>Escherichia coli</i> (Enterobacteriaceae)
03	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	<i>Escherichia coli</i> (Enterobacteriaceae)
04	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	<i>Enterococcus faecalis</i> (Streptococcaceae)
05	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	<i>Escherichia coli</i> (Enterobacteriaceae)
06	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	<i>Escherichia coli</i> (Enterobacteriaceae)
07	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	/	/	/	<i>Staphylococcus aureus</i> (Staphylococcaceae)
08	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	/	/	/	<i>Staphylococcus aureus</i> (Staphylococcaceae)
09	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	<i>Enterococcus faecalis</i> (Streptococcaceae)
10	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	/	/	/	<i>Staphylococcus aureus</i> (Staphylococcaceae)
11	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	<i>Enterococcus faecalis</i> (Streptococcaceae)
12	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	<i>Enterococcus faecalis</i> (Streptococcaceae)

+: presence; -: absence; /: unaccomplished

Antibacterial activity

Isolated strains used to evaluate antimicrobial activity showed an important resistance to the extract, *Tables 5* and *6* show the results.

The results showed that the antibacterial activity of the aqueous extract of the plant differs from one strain to another. An important antibacterial activity of the extract is observed for *Staphylococcus aureus* with zones of inhibition ranging from 21 ($\pm$ 1) to 31.33 ($\pm$ 1.5) mm, and positive controls for Erythromycin, Ciproflaxacin And clindamycin which showed respectively clear inhibition zones of 6 ($\pm$ 0) to 34 ($\pm$ 1) mm, 6 ($\pm$ 0.5) to 36 ($\pm$ 0.5) mm and 6 ($\pm$ 0) to 20 ($\pm$ 0.5) mm according to the strain (*Fig. 2*). A high sensitivity of *enterococcus faecalis* to the extract was noted with zones of inhibition ranging from 22 ($\pm$ 2) to 28.33 ($\pm$ 1.2) mm, and also positive controls for Erythromycin, Ciproflaxacin, clindamycin, And nalidixic acid with inhibition zones of 6 ($\pm$ 0.5) to 20 ($\pm$ 2.6) mm, 6 ($\pm$ 0) to 34 ($\pm$ 0) mm, 6 18 ($\pm$ 0) mm and 6 ($\pm$ 0.5) to 15 ($\pm$ 0) mm respectively (*Fig. 3*). Finally, a lower sensitivity was observed in *Escherichia coli* for the extract with an inhibition zone between 18.33 ($\pm$ 1.5) and 28.66 ($\pm$ 1.5) mm,

and positive controls for Ciproflaxacin, Clindamycin and carbenicillin with inhibition zones of 40 ($\pm$ 0) to 42 ($\pm$ 1) mm, 12 ($\pm$ 1) to 25 ($\pm$ 0) mm, and 8 ($\pm$ 0) to 32 ($\pm$ 1) mm respectively (Fig. 4).

Table 5. Antibiotic and extract susceptibility tests

Strain		Areas of Antibiotic Inhibition					Areas of extract inhibition
		E ₁₅	Cl ₂₅	Cip ₅	Cb ₁₀₀	NA ₃₀	
<i>Escherichia coli</i>	01	/	16 (S)	41 (S)	13 (S)	/	28 (S)
	02	/	12 (S)	42 (S)	32 (S)	/	19 (S)
	03	/	16 (S)	42 (S)	24 (S)	/	20 (S)
	04	/	25 (S)	40 (S)	8 (S)	/	18 (S)
<i>Staphylococcus aureus</i>	01	6 (R)	6 (R)	6 (R)	/	/	21 (S)
	02	34 (S)	8 (S)	34 (S)	/	/	28 (S)
	03	24 (S)	18 (S)	36 (S)	/	/	27 (S)
	04	34 (S)	20 (S)	36 (S)	/	/	32 (S)
<i>Enterococcus faecalis</i>	01	6 (R)	6 (R)	6 (R)	/	6 (R)	28 (S)
	02	18 (S)	12 (S)	16 (S)	/	15 (S)	22 (S)
	03	20 (S)	18 (S)	34 (S)	/	6 (R)	28 (S)
	04	6 (R)	6 (R)	6 (R)	/	6 (R)	26 (S)

S: sensitive; R: resistant; /: unaccomplished

Table 6. Values of minimum inhibitory concentrations

Strain		MIC _s (mg/ml)
<i>Escherichia coli</i>	01	61.78
	02	55.12
	03	55.12
	04	50.23
<i>Staphylococcus aureus</i>	01	1.47
	02	8.88
	03	3.25
	04	4.75
<i>Enterococcus faecalis</i>	01	23.23
	02	25.87
	03	19.87
	04	17.05

From the results obtained above, it is clear that the aqueous extract of *Euphorbia guyoniana* is much more active against the different microbial strains than the synthetic antibiotics by exhibiting larger zones of inhibition. These results are confirmed by significant tests with $p < 0.05$. Except for Ciproflaxacin, which exhibits slightly larger inhibition zones on the *Escherichia coli* strains compared to the extract. This important antibacterial activity is due to the richness of the extract in flavonoids, known to be effective antibacterial substances.

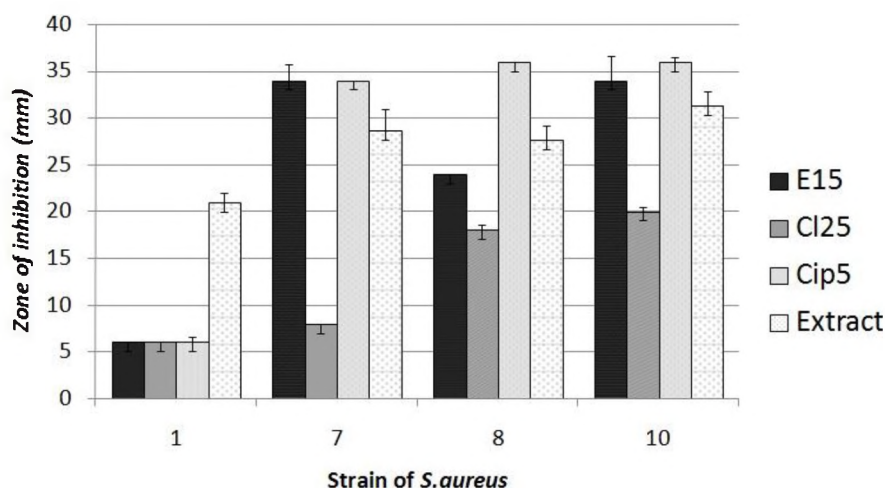


Figure 2. Sensitivity of *S. aureus* strains of the extract and antibiotics

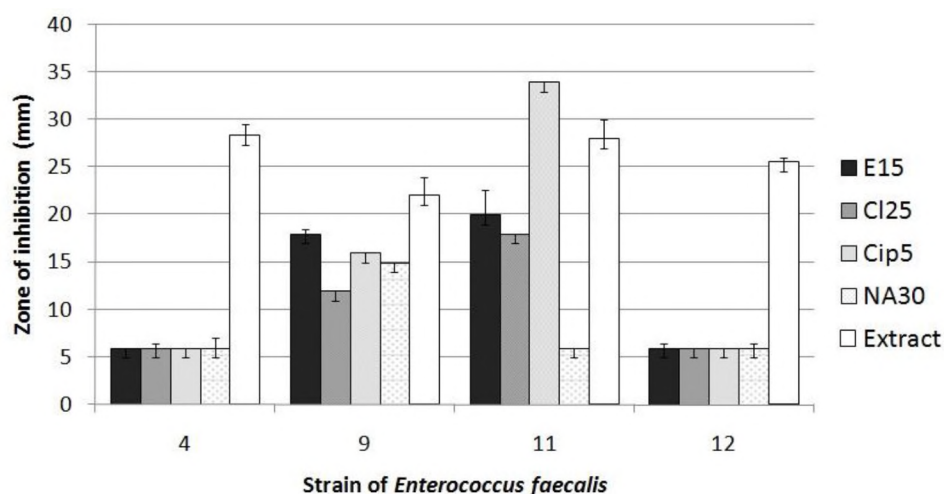


Figure 3. Sensitivity of the strains *Enterococcus faecalis* to the extract and antibiotics

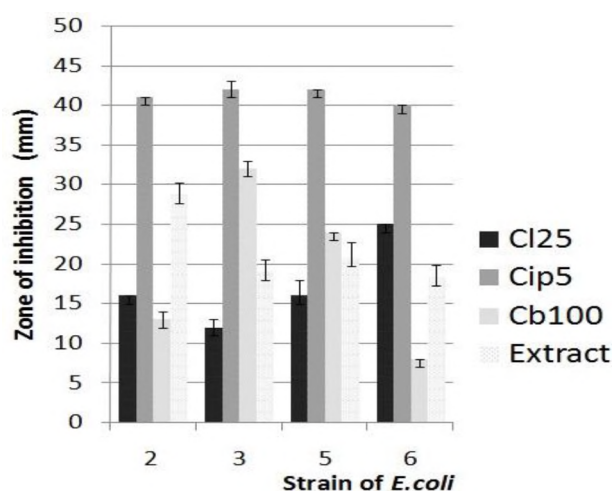


Figure 4. Sensitivity of *E. coli* to the extract and antibiotics

Discussion

The value of the flavonoid yield of the *Euphorbia guyoniana* plant found in our study (1.7%) was higher than that obtained by Kemassi (2014) for the aqueous extract of the same plant harvested from the Ghardaïa region which was obtained by Maceration with acetone, ie 0.082%. In addition, higher yields were noted by Herouini et al. (2015) for the flavonoid extract of the roots (6.3%) and the aerial part (4.3%) of *Euphorbia guyoniana* harvested in Oued sebseb (Algerian Sahara) obtained by reflux. According to Haba et al. (2008), *Euphorbia guyoniana* is a plant rich in secondary metabolites including diterpenes, triterpenes, steroids and aromatic compounds. The yield of flavonoids appears to depend on the nature of the biotope and the extraction method, knowing that the number of washes carried out in the extraction protocol could lead to substantial losses of the aglycones, hence the disadvantages of the method of extraction by solvent confrontation. Similar works have reported the existing of variability in the yield values extraction of secondary metabolite depending on the procedure of extraction (Moreira et al., 2005; Sagdic and Ozcan, 2003; Celiktaş et al., 2007; Turkmen et al., 2007).

Concerning the concentration of aqueous extract in flavonoids; Andrianarisoa and Tsirinirindravo (2009) found a concentration of approximately 63.39 µg/µl for the aqueous extract of the leaves of *Dalechampia clematidifolia* (Euphorbiaceae) harvested in Madagascar, which represents a significantly lower value to that found for the species *Euphorbia guyoniana*.

HPLC analysis by Smara et al. (2014) on the aerial parts of the same plant (*Euphorbia guyoniana*) harvested from the Oued Souf region (Algerian Sahara) revealed the presence of a hydrolyzable tannin, a single coumarin and two flavonoids (flavonol) namely Quercetin-3O-β-D-glucuronide and kaempferol-3O-β-D-glucuronide. In our study, Quercetin is detected as a molecule, and associated with galactoside, glucoside or rhamnoside. As for kaempferol, this compound is also identified in the free form.

Very little study concerning the antibacterial activity of the aqueous extract of *Euphorbia guyoniana* was carried out. Herouni et al. (2015) used separately the flavonoid aqueous extracts of the aerial and subterranean parts of *Euphorbia guyoniana* on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* isolated from several infections, and noted a less marked activity than that observed in our study. These authors obtained zones of inhibition comprised between 7 and 8 mm.

This difference in the inhibitory effect of the bacterial growth observed may be related to the richness of the extract tested in flavonoid compounds known for their antibacterial activity. In the case of this study, the important antibacterial effect observed can be attributed either to the richness of the extract of flavonoid compounds (ellagic acid, gallic acid, Myricetine, Quercetin-3-O-α-rhamnoside, Apigenin-Orutinoside, Hydroxytyrosol and Kaempferol) or to the virulence of the bacterial strain.

Moreover, the efficiency of an extract of a plant also depends on the extraction method (Moreira et al., 2005; Sagdic and Ozcan, 2003; Celiktaş et al., 2007; Turkmen et al., 2007), the part of the plant used (Yeo Sounta, 2014; Natarajan et al., 2005) and the harvest season.

Conclusion

The evaluation of the antibacterial activity of the aqueous flavonoid extract of the medicinal plant *Euphorbia guyoniana* showed a remarkable inhibitory effect on pathogenic bacteria of telluric origin. In perspective other studies are necessary for the development of formulations for pharmaceutical use based on this extract in order to fight against these pathogens.

Acknowledgements. The authors gratefully acknowledge the precious help of the Center for Scientific and Technical Research in Physico-Chemical Analysis (CRAPC) of Algeria and the Department of Biology of the University of Boumerdes of Algeria for valuable technical assistance.

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

REFERENCES

- [1] An, Y. J., Kampbell, D. H., Breidenbach, G. P. (2002): *Escherichia coli* and total coliforms in water and sediments at lake marinas. – Environ. Pollut. 120(3): 771-778.
- [2] Andrianarisoa, B., Tsirinirindravo, L. H. (2009): Antibacterial activities of leaf extract of *Dalechampia clematidifolia* (Euphorbiaceae). – Int. J. Biol. Chem. Sci. 3(5): 1198-1202.
- [3] Ayoola, G., Coker, H., Adesegun, S., Adepoju-Bello, A., Obaweya, K., Ezennia, E., Atangbayila, T. (2008): Phytochemical Screening and Antioxidant Activities of Some Selected Medicinal Plants Used for Malaria Therapy in Southwestern Nigeria. – Trop. J. Pharm. Res. 7(3): 1019-1024.
- [4] Bahorun, T., Grinier, B., Trotin, F., Brunet, G., Din, T., Luncky, M., Vasseur, J., Cazin, M., Cazin, C., Pinkas, M. (1996): Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. – Arzneimittelforschung 46(11): 1086-1089.
- [5] Belaiche, P. (1979): Traité de phytothérapie et d'aromathérapie Tome 1. L'aromatogramme. – M. S. A., Paris.
- [6] Bellakhdar, J. (1997): La Pharmacopée Marocaine Traditionnelle. Médecine arabe ancienne et savoirs populaires. – Ibis Press, Paris.
- [7] Berg, G., Eberl, L., Hartmann, A. (2005): The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. – Environ. Microbiol. 7(11): 1673-1685.
- [8] Bruneton, J. (1999): Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Tec & Doc. – Editions médicales internationales, Paris.
- [9] Byappanahalli, M. N., Whitman, R. L., Shively, D. A., Sadowsky, M., Ishii, S. (2006): Population structure, persistence, and seasonality of autochthonous *Escherichia coli* in temperate, coastal forest soil from a Great Lakes watershed. – Environ. Microbiol. 8(3): 504-513.
- [10] Byappanahalli, M., Roll, B., Fujioka, R. (2012): Evidence for occurrence, persistence, and growth potential of *Escherichia coli* and Enterococci in Hawaii's soil environments. – Microb. Environ. 27(2): 164-170.
- [11] Celiktaş, O. Y., Hames Kocabas, E. E., Bedir, E., Vardar Sukan, F., Ozek, T., Base, K. H. C. (2007): Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. – Food Chem. 100(2): 553-559.
- [12] Chenoweth, C., Schaberg, D. (1990): The epidemiology of enterococci. – Eur. J. Clin. Microbiol. 9(2): 80-89.
- [13] Colinon, C., Deredjian, A., Hien, E., Brothier, E., Bouziri, L., Cournoyer, B., Hartman, A., Henry, S., Jolivet, C., Ranjard, L. (2013): Detection and enumeration of *Pseudomonas*

- aeruginosa* in soil and manure assessed by an *ecfX* qPCR assay. – J Appl Microbiol 114(6): 1734-1749.
- [14] De Nazaré, D., Sebastião, F., Palmeira, J., Conserva, L., Lyra Lemos, R. (2005): Quinoline alkaloids from *Sebastiania corniculata* (Euphorbiaceae). – Biochem. Syst. Ecol. 33(5): 555-558.
 - [15] Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N. (2006): Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. – Food Chem. 97(4): 654-660.
 - [16] Franz, C. M. A. P., Holzapfel, W. H., Stiles, M. E. (1990): Enterococci at the crossroads of food safety?. – Int J Food Microbiol 47(1-2): 1-24.
 - [17] Freitag, N. E., Port, C. G., Miner, M. D. (2009): *Listeria monocytogenes* from saprophyte to intracellular pathogen. – Nat. Rev. Microbiol. 7(9): 623-628.
 - [18] Fujioka, R., Sian-Denton, C., Borja, M., Castro, J., Morphew, K. (1998): Soil: the environmental source of *Escherichia coli* and Enterococci in Guam's streams. – J Appl Microbiol 85(1): 83S-89S.
 - [19] Garbonnelle, B., Dens, F., Marmonier, A., Pinon, G., Vargues, R. (1987): Bactériologie médicale Techniques usuelles. – SIMEP, Paris.
 - [20] Haba, H. (2008): Etude phytochimique de deux Euphorbiaceae sahariennes: *Euphorbia guyoniana* Boiss. & Reut. et *Euphorbia retusa* Forsk. – PhD Thesis, University of Batna, Algeria.
 - [21] Herouini, A., Kemassi, A., Ould El Hadj, M. D. (2015): Etude de l'activité biologique des extraits aqueux d'*Euphorbia guyoniana* (Euphorbiaceae) récoltée dans Oued Sebseb (Sahara Algérien). – el-wahat 8(2): 15-25.
 - [22] Hunsä, P., Chulabhorn, M., Ruchirawat, S., Prawat, U., Tuntiwachwuttikul, P., Tooptakong, U., Taylor, W. C., Pakawatchai, C., Brian, W., Skelton, B. W., Allen, H. (1995): Cyanogenic and non-cyanogenic glycosides from *Manihot esculenta*. – Phytochemistry 40(4): 1167-1173.
 - [23] Jett, B. D., Huycke, M. M., Gilmore, M. S. (1994): Virulence of enterococci. – Clin. Microbiol. Rev 7(4): 462-478.
 - [24] Joffin, N., Leyral, G. (2014): Microbiologie technique. Dictionnaire des techniques. – Canopé-CRDP, Bordeaux.
 - [25] Kemassi, A. (2014): Toxicité comparée des extraits d'*Euphorbia guyoniana* (Stapf.) (Euphorbiaceae), *Cleome arabica* L. (Capparidaceae) et de *Capparis spinosa* L. (Capparidaceae) récoltés de la région de Ghardaïa (Sahara septentrional) sur les larves du cinquième stade et les adultes de *Schistocerca gregaria* (Forsk., 1775) (Orthoptera-Cyrtacanthacridinae). – PhD Thesis, Kasdi Merbah University, Ouargla, Algeria.
 - [26] Koba, K., Sanda, K., Raynaud, C., Nenonene, Y. A., Millet, J., Chaumont Loziene, K., Venskutonis, P. R., Sipailien, A., Labokas, J. (2017): Radical scavenging and antibacterial properties of the extracts from different *Thymus pulegioides* L. chemotypes. – Food Chem 103(2): 546-559.
 - [27] Leclerc, H., Devriese, L. A., Mossel, D. A. A. (1996): Taxonomical changes in intestinal (faecal) enterococci and streptococci: consequences on their use as indicators of faecal contamination in drinking water. – J Appl Microbiol 81(5): 459-466.
 - [28] Locatelli, A. (2013): Prévalence de pathogènes humains dans les sols français, effet des facteurs pédoclimatiques, biologiques et du mode d'utilisation des sols. – PhD Thesis, Université de Bourgogne, Dijon, France.
 - [29] Mabry, T. J., Markham, K. R., Thomas, M. B. (1970): The Systematic Identification of Flavonoids. – Springer, New York.
 - [30] Mavar, M. H., Brick, D., Marie, D. E. P., Quetin-Leclercq, J. (2004): In vivo anti-inflammatory activity of *Alchornea cordifolia* (Schumacher & Thonn.) Müll. Arg. (Euphorbiaceae). – J Ethnopharmacol 92(3): 209-214.

- [31] Mazoir, N. A., Benharref, M., Bailén, M., Reina, M., Onzálezcoloma, A. (2008): Bioactive triterpene derivatives from latex of two *Euphorbia* species. – *Phytochemistry* 69(6): 1328-1338.
- [32] Moreira, M. R., Ponce, A. G., Del Valle, C. E., Roura, S. I. (2005): Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. – *Food Sci. Technol.* 38(5): 565-570.
- [33] Morrison, D., Woodford, N., Cookson, B. (1997): Enterococci as emerging pathogens of humans. – *J Appl Microbiol* 83(S1): 89S-99S.
- [34] Mundt, J. O. (1961): Occurrence of Enterococci: bud, blossom, and soil studies. – *Appl Microbiol* 9(6): 541-544.
- [35] Natarajan, K., Kumaresan, V., Narayanan, K. (2005): A check list of Indian agarics and boletes (1984-2002). – *Kavaka* 33: 61-128.
- [36] Noble, C. J. (1978): Carriage of group D streptococci in the human bowel. – *J Clin Pathol* 31(12): 1182-1186.
- [37] Ostyn, A., De Buyser, M. L., Guillier, F., Krys, S., Hennekinne, J. A. (2012): Benefits of the combined use of immunological- and PCR- based methods for determination of staphylococcal enterotoxin food safety criteria in cheese. – *Food Anal Methods* 2: 173-178.
- [38] Raaijmakers, J. M., Timothy, C. P., Steinberg, C., Alabouvette, C., Moënné-Loccoz, Y. (2009): The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. – *Plant Soil* 321(1): 341-361.
- [39] Ran, Q., Badgley, B. D., Dillon, N., Dunne, G. M., Sadowsky, M. J. (2013): Occurrence, genetic diversity, and persistence of Enterococci in a lake superior watershed. – *Appl. Environ. Microbiol.* 79(9): 3067-3075.
- [40] Reis, A. L. S., Montanhini, M. T. M., Bittencourt, J. V. M., Destro, M. T., Bersot, L. S. (2014): Gene detection and toxin production evaluation of hemolysin BL of *Bacillus cereus* isolated from milk and dairy products marketed in Brazil. – *Braz J Microbiol* 44(4): 1195-1198.
- [41] Sagdic, O., Ozcan, M. (2003): Antibacterial activity of Turkish spice hydrosols. – *Food Control* 14(3): 141-143.
- [42] Smara, O., Julia, A., Moral-Salmi, C., Vigor, C., Vercauteren, J., Legseir, B. (2014): Flavonoids from *Euphorbia guyoniana* Boissier & Reuter. – *J. Life Sci* 8(6): 544-551.
- [43] Smith, L. D. (1978): The occurrence of *Clostridium botulinum* and *Clostridium tetani* in the soil of the United States. – *Health Lab Sci* 15(2): 74-80.
- [44] Smith, L. D. S. (1979): *Clostridium botulinum*: Characteristics and occurrence. – *Rev Infect Dis* 1(4): 637-641.
- [45] Solo-Gabriele, H. M., Wolfert, M. A., Desmarais, T. R., Palmer, C. J. (2000): Sources of *Escherichia coli* in a coastal subtropical environment. – *Appl Environ Microbiol* 66(1): 230-237.
- [46] Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., Denamur, E. (2010): The population genetics of commensal *Escherichia coli*. – *Nature Rev. Microbiol.* 8(3): 207-217.
- [47] Ticknor, L. O., Kolsto, A. B., Hill, K. K., Keim, P., Laker, M. T., Tonks, M., Jackson, J. P. (2001): Fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis of Norwegian *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* soil isolates. – *Appl Environ Microbiol* 67(10): 4863-4873.
- [48] Tramier, R. (1986): Pathogens from land-based sources; Means of intervention and biocenosis. – *OEPP Bull* 16(2): 299-310.
- [49] Tripathi, R. D., Tiwari, K. P. (1980): Geniculatin, a triterpenoid saponin from *Euphorbia geniculata*. – *Phytochem* 19(10): 2163-2166.
- [50] Turkmen, N., Velioglu, Y. S., Sari, F., Polat, G. (2007): Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea. – *Molecules* 12(3): 484-496.

- [51] Valenzuela, A. S., Benomar, N., Abriouel, H., Pulido, R. P., Cañamero, M. M., Gálvez, A. (2012): Characterization of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from wild flowers. – Anton. Leeuw. Int. J. G 101(4): 701-711.
- [52] Vidhyasekaran, P., Sethuraman, K., Rajappan, K., Vasumathi, K. (1997): Powder formulations of *Pseudomonas fluorescens* to control pigeonpea wilt. – Bio. Control 8(3) 166-171.
- [53] Wheeler, A. L., Hartel, P. G., Godfrey, D. G., Hill, J. L., Segars, W. I. (2001): Potential of as a human fecal indicator for microbial source tracking. – J. Environ. Qual. 31(4): 1286-1293.
- [54] Yeo Sounta, O., Guessennnd Kouadio, N., Meité, S., Ouattara, K., Bahi Gnogbo, A., N'Guessan, J. D., Coulibaly, A. (2014): In vitro antioxidant activity of extracts of the root *Cochlospermum planchonii* Hook. f. ex. Planch (Cochlospermaceae). – J. Pharmacogn. Phytochem. 3(4): 164-170.

Abstract

Guyon's Euphorbia, *Euphorbia guyoniana* Boiss, is a plant endemic to Algeria and used in traditional medicine. In order to provide proof of its harmlessness and to enhance its virtues, a phytochemical study and an evaluation of the effect of aqueous extract and essential oils on pathogenic bacteria isolated and identified from different soils were carried out.

The phytochemical study revealed a high content of saponosides, alkaloids, lipoids, glucosides, reducing sugars and an average content of total tannins, coumarins, flavonoids, mucilages, polyphenols. Analysis of the aqueous extract by HPLC revealed the presence of 41 flavonoid compounds, of which 27 could be identified. On the other hand GC-MS analysis of the essential oils of the same plant revealed only the presence of a single compound forming part of the constituents of the latex.

Antibacterial activity was tested on sixteen bacterial species isolated from stable soil, potato and hen house and identified by biochemical galleries and VITEK. In total (77) bacteria divided into six families were identified: Staphylococcaceae (09), Enterobacteriaceae (44), Streptococcaceae (05), Pseudomonadaceae (10), Moraxellaceae (05) and Enterococcaceae (04). The antibacterial test was carried out according to the solid medium diffusion method. Both extracts showed good antimicrobial activity. The MICs obtained with the aqueous extract ranged from 0.07 mg / ml for *Pseudomonas aeruginosa* to 61.78 mg / ml for *Escherichia coli*.

Thus, in conclusion, the aqueous flavonoid extract and the essential oil of *Euphorbia guyoniana* may constitute an alternative to the chemical control of certain pathogenic bacteria. **Key words:** Antibacterial activity, pathogenic bacteria, *Euphorbia guyoniana*, flavonoids, essential oils, soil, VITEK.

ملخص

غويون الفربيون ، الفربيون جايونيانا بواس ، هو نبات مستوطن في الجزائر ويستخدم في الطب التقليدي. من أجل تقديم دليل على عدم ضررها وتعزيز فوائدها ، تم إجراء دراسة كيميائية نباتية وتقييم تأثير المستخلص المائي والزيوت الأساسية على البكتيريا المسببة للأمراض المعزولة والمحددة من أنواع مختلفة من التربة . وكشفت الدراسة الكيميائية النباتية عن وجود نسبة عالية من السابونوسيدات ، القلويدات ، الشحوم ، الجلوكوزيدات ، والحد من السكر ومحتوى متوسط من مجموع الثانينات ، الكومارين ، الفلافونويد ، الصمغ ، البوليفينول . تحليل المستخلص المائي بواسطة HPLC كشف عن وجود 41 مركب الفلافونويد ، منها 27 تم تحديدها. من ناحية أخرى ، كشف تحليل GC-MS للزيوت الأساسية للنبات نفسه عن وجود مركب واحد فقط يشكل جزءا من مكونات اللاتكس. تم اختبار النشاط المضاد للبكتيريا على ستة عشر نوعا من البكتيريا المعزولة من التربة وتم التعرف عليها من خلال معارض الكيمياء الحيوية و VITEK .

في المجموع تم تحديد (77) بكتيريا مقسمة إلى ست عائلات:

Staphylococcaceae (09), *Enterobacteriaceae* (44), *Streptococcaceae* (05), *Pseudomonadaceae* (10), *Moraxellaceae* (05) et *Enterococcaceae* (04).

تم إجراء الاختبار المضاد للبكتيريا وفقاً لطريقة الانتشار على الوسط الصلب.

أظهر كلا المستخلصين نشاطاً جيداً مضاداً للبكتيريا

تراوحت قيم MICs التي تم الحصول عليها مع المستخلص المائي من 0.07 م ل/غ مل لل

Escherichia coli إلى 61.78 م ل/غ مل من أجل *Escherichia coli*.

وهكذا ، في الختام ، قد يشكل مستخلص الفلافونويد المائي والزيوت الأساسية من الفربيون بديلاً للسيطرة الكيميائية لبعض البكتيريا المسببة للأمراض.

الكلمات المفتاحية : النشاط المضاد للجراثيم ، البكتيريا المسببة للأمراض ، الفربيون ، الفلافونويد ، الزيوت الأساسية ، والتربة ، VITEK .