

ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE



DEPARTEMENT DE GENIE DE L'ENVIRONNEMENT

Laboratoire des Biotechnologies Environnementales et Génie des Procédés (BIOGEP)

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTORAT EN GENIE DE L'ENVIRONNEMENT

Présenté par

M^{me} ARBIA Leila épouse HAMEL

Magister en Génie de l'environnement

Thème

*Etude de l'effet antibactérien des extraits végétaux
sur les bactéries parodontales*

Présentée devant le jury :

PRESIDENT :	BOUARAB RABAH	Pr. E. N. P
EXAMINATEURS:	KEBBOUCHE SALIMA	Pr U BOUMERDES
	SALEM ZINEB	Pr USTHB
	ABDI NADIA	Pr. E.N.P
	DROUCHE MADANI	Pr. E.N.P
Invité:	GANA MOHAMED LAMINE	MR. CRD
DIRECTEURS DE THESE :	CHORFI-CHIKHI NASSIMA	MCA ENSV
	LOUNICI HAKIM	Pr. U.AM.OB/BIOGEP

ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو تحديد النشاط المضاد للبكتيريا من طرف الجزيئات ذات النشاطات البيولوجية المستخرجة من النباتات الطبية ضد البكتيريا المسؤولة عن أمراض اللثة. نتائج هذه الدراسة تشير إلى أن جميع المستخلصات لها نشاط مضاد للجراثيم للسلاسل السريرية *P. gingivalis* و *P. intermedia* و السلالة المرجعية *P. gingivalis* ATCC 33277 بكفاءة متفاوتة اعتمادا على طبيعة المستخلص.

و أظهرت النتائج كذلك أن المستخلصات المائية للنباتات *A. herba – alba*، *O. ficus – indica* و *C. sinensis* و *P. crinita* لديهم أقطار تثبيط للبكتيريا *P. gingivalis* التي تتراوح بين $0,85 \pm 31,17$ مم - $1,03 \pm 48,83$ مم، $0,82 \pm 31,83$ مم - $0,82 \pm 49,00$ مم ، ، $2,62 \pm 21,33$ مم - $2,62 \pm 42,00$ مم ، $0,36 \pm 7,54$ مم - $0,41 \pm 10,50$ مم على التوالي. و كانت النتائج التي تم الحصول عليها مع السلالة المرجعية *P. gingivalis* ATCC 33277 متطابقة تماما مع النتائج المتحصل عليها مع السلالات السريرية. و كان تثبيط *P. intermedia* من قبل *O. ficus – indica* و *C. sinensis* فعال جدا و لوحظ أيضا وجود إرتباط جيد جدا ($P < 0,05$). و هذا يفسر العلاقة الموجودة بين كمية النبات تركيز المستخلص و بالتالي تركيز البولي فينول. أما بالنسبة للزيوت الأساسية للنباتة *A. herba-alba* ، تظهر نتائج التثبيط : $15 \pm 0,08$ - $40 \pm 0,08$ مم و $18,33 \pm 0,47$ - $34,63 \pm 0,44$ مم : *P. intermedia* و *P. gingivalis* على التوالي.

الكلمات المفتاحية : *A. herba-alba* ، *O. ficus-indica* ، *C. sinensis* ، *P. crinita* ، البولي فينول ، النشاط المضاد للجراثيم ، أمراض اللثة ، *P. intermedia* ، *P. gingivalis* .

Résumé

L'objectif de cette étude est porté sur la détermination de l'activité antibactérienne des molécules bioactives, extraites à partir des plantes médicinales, contre les bactéries responsables de la maladie parodontale. Les résultats concernant la mise en évidence de l'activité antibactérienne des extraits végétaux, indiquent que tous les extraits présentent une activité antibactérienne vis-à-vis des souches cliniques (*P. gingivalis* et *P. intermedia*) et de la souche de référence de *P. gingivalis* ATCC 33277, avec une efficacité plus ou moins variable selon la nature de l'extrait testé.

Les résultats montrent que les extraits aqueux des quatre plantes, *A. herba-alba* *O. ficus-indica*, *Camellia sinensis* et *Phlomis crinita* présentent des diamètres d'inhibition du *P. gingivalis* qui varient entre $31,83 \pm 0,24$ mm - $49,00 \pm 0,82$ mm, $31,17 \pm 0,85$ mm - $48,83 \pm 1,03$ mm, $21,33 \pm 2,62$ mm - $42,00 \pm 2,62$ mm et $07,54 \pm 0,36$ - $10,50 \pm 0,41$ mm, respectivement. Les résultats obtenus avec la souche de référence *P. gingivalis* ATCC33277 pour tous les extraits, étaient similaires à ceux obtenus avec les souches cliniques de *P. gingivalis*.

L'inhibition de *P. intermedia* par *O. ficus-indica* et *Camellia sinensis* a été très efficace. Une très bonne corrélation significative ($p < 0,05$) a été observée par la courbe de régression. Quant à l'huile essentielle (HE) d'*A. herba-alba*, les résultats affichent des diamètres d'inhibition de $15 \pm 0,00$ mm à $40 \pm 0,08$ mm et de $18,33 \pm 0,47$ à $34,63 \pm 0,44$ mm pour *P. gingivalis* et *P. intermedia*, respectivement.

Mots clés : *A. herba-alba* *O. ficus-indica*, *Camellia sinensis* et *Phlomis crinita*, Polyphénols totaux, activité antibactérienne, maladie parodontale, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*

Summary

The aim of this study is to determine the antibacterial activity of bioactive molecules, extracted from medicinal plants, against the bacteria responsible for periodontal disease. The results concerning the demonstration of the antibacterial activity of the plant extracts indicate that all the extracts show an antibacterial activity with respect to the clinical strains (*P. gingivalis* and *P. intermedia*) and of the reference strain of *P. gingivalis* ATCC 33277, with a more or less variable efficiency depending on the nature of the extract tested. The results show that the aqueous extracts of the four plants, *A. herba-alba* *O. ficus-indica*, *Camellia sinensis* and *Phlomis crinita* have diameters of inhibition of *P. gingivalis* which vary between $31,83 \pm 0,24$ mm - $49,00 \pm 0,82$ mm, $31,17 \pm 0,85$ mm - $48,83 \pm 1,03$ mm, $21,33 \pm 2,62$ mm - $42,00 \pm 2,62$ mm and $07,54 \pm 0,36$ - $10,50 \pm 0,41$ mm, respectively. The results obtained with the reference strain *P. gingivalis* ATCC33277 for all the extracts were similar to those obtained with the clinical strains of *P. gingivalis*. Inhibition of *P. intermedia* by *O. ficus-indica* and *Camellia sinensis* was very effective. A very good correlation ($p < 0,05$) was observed by the regression curve. This explains the link that exists between the concentrations of the plant extract therefore in PPT (total polyphenols). As for the essential oil (HE) of *A. herba-alba*, the results show inhibition diameters of $15 \pm 0,00$ mm à $40 \pm 0,08$ mm and $18,33 \pm 0,47$ à $34,63 \pm 0,44$ mm for *P. gingivalis* and *P. intermedia*, respectively.

Key words: *A. herba-alba* *O. ficus-indica*, *Camellia sinensis* and *Phlomis crinita*, total polyphenols, antibacterial activity, periodontal disease, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*

Dédicace

Je dédie ce travail à :

Mes très chers parents qui m'ont donné de leur affection, de leur attention, de leur temps et de leur vie pour que je réussisse

Votre fille vous aime énormément

Mon cher mari AHMED pour ses petites attentions, sa compréhension et son écoute

Ma famille ARBIA

Ma belle-famille HAMEL

A la mémoire de l'écrivain Honoré de Balzac qui m'a appris à travers son titre « le médecin de compagne » à évoluer ma perception des choses

Lila

« N'avez-vous pas surpris dans votre cœur quelque tristesse en rencontrant un arbre dont les feuilles étaient jaunes au milieu du printemps, un arbre languissant et mourant faute d'avoir été planté dans le terrain où se trouvaient les principes nécessaires à son entier développement ? »

Honoré de Balzac

Aux chercheurs de BioGep

Remerciements

Au terme de ce travail je tiens à remercier ceux qui m'ont aidé à le réaliser, et qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde reconnaissance. Ma profonde gratitude s'adresse avant tout au Pr. LOUNICI HAKIM et au Dr. CHORFI-CHIKHI NASSIMA mes encadreurs, qui ont accepté de diriger mon travail et m'ont accordé tout leur attention, leurs encouragements et leur patience pour l'accomplir.

Au Pr. BOUARAB RABAH, de l'Ecole Nationale Polytechnique, qui m'a fait l'honneur de présider ce jury. Aux Pr. KEBBOUCHE SALIMA de l'université de Boumerdès, Pr. SALEM ZINEB de l'USTHB, Pr. ABDI NADIA de l'ENP, Pr. DROUCHE MADANI de l'ENP qui ont examiné ce travail et ont accepté de faire partie du jury.

Au Dr. GANA MOHAMED LAMINE Maître de recherche au CRD d'accepté d'être notre invité d'honneur.

Mes vifs remerciements s'adressent aux :

Pr. MAMERI NABIL de l'ENP qui m'a énormément aidé au cours de la réalisation de mon projet de recherche.

Dr. MERAD ASMA SAIDA Chef de service des anaérobies et du botulisme à l'institut Pasteur d'Alger de m'avoir accueilli au sein de son service et de ses précieux conseils pour la réalisation de mon travail.

Dr. BETATACHE ILHAM et Mr. LAICHOUCI REZKI du service des anaérobies et du botulisme à l'institut Pasteur d'Alger de m'avoir aidé tout le long de la préparation de cette thèse.

Mme ZENIA SAFIA MAA à l'ENSV de m'avoir aidé à effectuer l'étude statistique réalisée lors ce projet.

Dr. PHILLIPE BOUVET et Dr. MICHEL R POPFF et la responsable CHRISTELLE MAZUET du centre national de référence des Bactéries anaérobies et du botulisme de l'institut Pasteur de Paris, de leur générosité de m'envoyer gracieusement la souche de référence et de m'avoir fait l'identification de mes souches par le séquençage.

Au corps des responsables et ingénieurs du centre de recherche et des analyses physicochimiques (CRAPC) pour leur collaboration afin de réussir la réalisation de ce projet notamment le directeur Dr. BACHARI KHALDOUN, le chef de département HAMITOUCHE ADHY'A EDDINE, les ingénieurs : KACED AMEL et ABOUMUSTAPHA MOHAMED.

A Melle CHAUCHE FOUZIA, MAA à l'ENS de son apport précieux sur l'utilisation du logiciel de l'identification des souches.

Je remercie également, HAMIDA, secrétaire du département Génie de l'Environnement de l'ENP.

Merci à mon mari AHMED pour son soutien, son aide, ses conseils, ses sacrifices et sa patience qui m'a accordé lors de la préparation de ma thèse.

Je remercie toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce projet.

Merci

Sommaire

Introduction.....	1
Chapitre 1 La maladie parodontale	
1.1. Les biofilms buccaux.....	5
1.1.1. Attachement réversible.....	6
1.1.2. Attachement irréversible.....	7
1.1.3. Interactions bactériennes.....	7
1.1.4. Maturation du biofilm.....	10
1.2. Le parodonte.....	11
1.3. Les maladies parodontales.....	11
1.4. Les bactéries parodontopathogènes.....	13
1.4.1. <i>Porphyromonas gingivalis</i>	16
1.4.2. <i>Prevotella intermedia</i>	17
1.5. Les maladies systémiques liées à la parodontite.....	18
Chapitre 2 Les plantes médicinales	
2.1. <i>Artemisia herba-alba</i> (armoise blanche).....	22
2.1.1. Classification.....	22
2.1.2. Les principaux constituants bioactifs d' <i>A. herba-alba</i>	24
2.1.3. Domaine d'application de la plante <i>Artemisia herba-alba</i>	25
2.2. <i>Opuntia ficus indica</i> (Figuier de barbarie).....	26
2.2.1. Classification.....	26
2.2.2. Les principaux constituants bioactifs d' <i>Opuntia ficus-indica</i>	27
2.2.3. Domaine d'application de la plante <i>Opuntia ficus-indica</i>	28
2.3. <i>Camellia sinensis</i> (Thé vert).....	31
2.3.1. Historique du thé vert.....	31
2.3.1.1. La découverte de l'empereur Sheng Nung.....	31
2.3.2. Classification.....	32
2.3.3. Les principaux constituants bioactifs de <i>Camellia sinensis</i>	33
2.3.4. Domaine d'applications de la plante <i>Camellia sinensis</i>	34
2.4. <i>Phlomis crinita</i>	37
2.4.1. Classification.....	37

2.4.2. Les principaux constituants bioactifs de <i>Phlomis crinita</i>	38
2.4.3. Domaine d'applications de la plante <i>Phlomis crinita</i>	39
Chapitre 3 Les molécules bioactives	
3.1. Les polyphénols.....	40
3.1.1. Principales structures phénoliques.....	40
3.1.1.1. Acides phénoliques.....	40
3.1.1.1.1. Acides hydroxybenzoïques.....	40
3.1.1.1.2. Acides hydroxycinnamiques.....	41
3.1.1.1.3. Coumarines.....	42
3.1.1.2. Les flavonoïdes.....	42
3.1.1.2.1. Flavonols.....	43
3.1.1.2.2. Flavones et flavonoïdes.....	43
3.1.1.3. Tanins.....	45
3.1.1.3.1. Tanins hydrolysables.....	45
3.1.1.3.2. Tanins condensés.....	45
3.1.1.4. Lignines.....	45
3.1.1.5. Stilbènes.....	46
3.1.2. Biosynthèse des composés phénoliques.....	46
3.1.3. Les composés phénoliques dans les aliments.....	48
3.1.4. Le rôle des composés phénoliques dans la plante.....	51
3.1.5. Les Activités biologiques des polyphénols.....	52
3.1.5.1. Protection cardiovasculaire.....	52
3.1.5.2. Activité anti-cancérigène.....	53
3.1.5.3. Activité anti-inflammatoire.....	54
3.1.5.4. Activité antioxydante.....	54
3.1.5.5. Activité antibactérienne.....	55
3.2. Les huiles essentielles.....	56
3.2.1. La composition chimique des huiles essentielles.....	57
3.2.1.1. Classe des terpènes et terpénoïdes.....	57
3.2.1.2. Classe des phénylpropanoïdes.....	57

3.2.1.3. Composés nitriques et sulfuriques.....	57
3.2.2. Les voies de biosynthèse des huiles essentielles.....	58
3.2.3. Les activités biologiques des huiles essentielles.....	58
3.2.3.1. Activité antioxydante.....	58
3.2.3.2. Activité antibactérienne.....	60
3.2.3.3. Activité anticancéreuse.....	60
3.2.3.4. Activité anti-inflammatoire.....	61
Chapitre 4 Matériel et méthodes	
4.1. Matériel végétal.....	62
4.2. Microorganismes choisis.....	62
4.3. Analyses physicochimiques des plantes.....	62
4.3.1. Le taux d'humidité et la matière sèche.....	62
4.3.2. Les cendres.....	63
4.3.3. Analyse par spectroscopie infrarouge de la plante sèche.....	63
4.4. Extraction des huiles essentielles.....	64
4.4.1. Extraction par hydro distillation.....	64
4.4.2. Caractérisation des huiles essentielles.....	65
4.4.2.1. Caractéristique organoleptique.....	65
4.4.2.2. Propriétés physico-chimiques.....	65
4.4.2.2.1. L'indice de réfraction.....	65
4.4.2.2.2. La densité relative.....	66
4.4.2.2.3. L'indice d'acide.....	66
4.4.2.2.4. L'indice d'ester.....	66
4.4.2.2.5. Le point de congélation.....	67
4.4.2.2.6. Détermination du pH de l'huile essentielle.....	67
4.4.2.3. Analyses physicochimiques des huiles essentielles.....	67
4.4.2.3.1. Spectroscopie infrarouge par FTIR.....	67
4.4.2.3.2. Chromatographe en phase gazeuse-spectrométrie de masse.....	68
4.5. Préparation des extraits de plantes.....	68
4.5.1. Préparation du gel d' <i>Opuntia ficus indica</i>	68

4.5.2. Extraction en milieu aqueux.....	69
4.5.3. Etude phytochimique.....	69
4.5.3.1. Dosage des polyphénols totaux de chaque extrait de plante.....	69
4.6. Prélèvement, isolement et identification des souches cliniques de <i>P. gingivalis</i> et <i>P. intermedia</i>	69
4.6.1. Prélèvement, isolement et identification de souches cliniques.....	69
4.6.1.1. Prélèvement et isolement.....	69
4.6.1.2. Identification des souches.....	70
- Identification phénotypique.....	70
- Identification génotypique.....	71
- Identification protéomique.....	74
4.7. Conservation des souches.....	76
4.8. Mise en évidence de l'activité antibactérienne des extraits végétaux.....	77
4.8.1. Méthode des disques.....	77
4.9. Détermination de la concentration minimale inhibitrice.....	77
4.9.1. Préparation de l'échantillon.....	77
4.9.2. Méthode de diffusion en agar.....	79
4.9.3. Préparation de l'inoculum.....	79
10. Etude statistique.....	80
Chapitre 5 Résultats et discussions	
5.1. Analyses physicochimiques des plantes étudiées.....	82
5.2. Caractérisation des huiles essentielles d' <i>A. herba-alba</i>	87
5.2.1. Caractères organoleptiques de l'huile d' <i>Artemisia herba alba</i>	87
5.2.2. Détermination du rendement de l'huile essentielle obtenue.....	88
5.2.3. Propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle d' <i>A. herba- alba</i>	89
5.2.4. Analyse infrarouge de l'huile essentielle d' <i>A. herba-alba</i>	91
5.2.5. Analyse de la composition chimique de l'HE de la plante <i>A. herba alba</i> par GC/MS.....	91
5.3. Identification des souches.....	101
5.3.1. Coloration de Gram d'un prélèvement intrasulculaire.....	104

5.3.1.1. Flore des sillons sains.....	104
5.3.1.2. Flore des maladies parodontales.....	104
5.3.2. Isolement, purification et identification des souches: <i>Porphyromonas gingivalis</i> et <i>Prevotella intermedia</i>	106
5.3.2.1. Identification de la souche <i>P. gingivalis</i> par PCR.....	109
5.3.2.2. Identification de <i>P. intermedia</i> et <i>P. gingivalis</i> par la technique de spectrométrie de masse MALDI-TOF / MS.....	111
5.3.2.3. Identification de la souche <i>P. intermedia</i> par le séquençage de l'ARN 16S.....	123
5.4. Etude l'activité antibactérienne des extraits végétaux.....	129
5.5. Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d' <i>A. herba alba</i>	141
Conclusion.....	152
Références bibliographiques.....	157
Annexes.....	178

Figure n° 1(a): Chronologie de la formation du biofilm dentaire de l'étape 1 à l'étape 3.....	8
Figure n° 1(b) : Chronologie de la formation du biofilm dentaire de l'étape 4 à l'étape 5..	9
Figure n° 2 : Pathologie de la maladie parodontale. E: émail, D: dentine, PC: pulpe camérale, PR: pulpe radiculaire, LP: ligament parodontal, C: cément, FA: foramen apical, PVN: plexus vasculo-nerveux, OA: os alvéolaire, PP: poche parodontale, EG: épithélium gingival, CG: conjonctif gingival, Ca: canaux apicaux, C lat: canaux latéraux.....	12
Figure n° 3 : Différentes espèces bactériennes provenant d'échantillons de plaques sous-gingivales apparaissent ensemble formant différents groupes bien définis. La figure montre les différents grappes ou "complexes" de bactéries qui apparaissent en association avec une plaque sous-gingivale. La grappe rouge apparaît toujours associée à une parodontite sévère et non à des échantillons sains. La flèche rouge montre la succession de complexes de santé à maladie ainsi que leur emplacement dans la poche parodontale.....	17
Figure n° 4 : a. Infections orales et Figure 4b: manifestations du système à partir de la migration orale.	20
Figure n° 5 : Une. Horloge microbienne: maladies et b Horloge microbienne: microbe migratoire.	21 23
Figure n° 6 : Photo de la plante <i>Artemisia herba- alba</i>	27
Figure n° 7 : Photo de la plante <i>Opuntia ficus-indica</i>	32
Figure n° 8 : Photo de la plante <i>Camellia sinensis</i>	37
Figure n° 9 : Photo de la plante <i>Phlomis crinita</i>	41
Figure n°10 : Structure chimique de l'acide hydroxybenzoïques.....	41
Figure n°11 : Structure chimique de l'acide hydroxycinnamique.....	42
Figure n° 12 : Structure des principaux acides phénoliques.....	44
Figure n° 13 : Les principales classes de flavonoïdes.....	46

Figure n° 14 : Exemple de structure d'un tanin condensé.....	
Figure n° 15 : Les grandes lignes de la biosynthèse de principaux groupes de composés phénoliques.....	48
Figure n° 16 : Localisation cellulaire des principales voies de synthèse des HE chez les végétaux.....	58 61
Figure n° 17 : Mécanismes d'action antitumorale des HE.....	65
Figure n° 18 : Photo représente le montage de l'hydrodistillation.....	
Figure n° 19 : Photo de l'ampoule à décanter représentant les deux phases organique et aqueuse.....	65
Figure n° 20 : Illustration schématique d'un spectromètre de masse à laser UV linéaire MALDI-TOF.....	75
Figure n° 21 : Spectre infrarouge de la plante <i>Artemisia herba-alba</i> avant hydrodistillation.....	84
Figure n° 22 : Spectre infrarouge de la plante <i>Artemisia herba-alba</i> après hydrodistillation.....	84 85
Figure n° 23 : Spectre infrarouge de la plante <i>Opuntia ficus indica</i>	86
Figure n° 24 : Spectre infrarouge de la plante <i>Phlomis crinita</i>	87
Figure n° 25 : Spectre infrarouge de la plante <i>Camellia sinensis</i>	89
Figure n° 26 : Variation du rendement des HE en fonction de la masse brute du végétal...	89
Figure n° 27 : Variation du rendement de l'HE en fonction de l'humidité de la plante.....	91
Figure n° 28 : Spectre infrarouge de l'huile essentielle d' <i>Artemisia herba-alba</i>	
Figure n° 29 : Spectre GC-MS de l'huile essentielle d' <i>Artemisia herba alba</i> de la région de Biskra.....	93
Figure n° 30 : Variation des composants majeurs retrouvés dans l'huile essentielle d' <i>Artemisia herba-alba</i> de la région de Biskra.....	94
Figure n° 31 : Spectre GC-MS de l'huile essentielle d' <i>Artemisia herba-alba</i> de la région de Bousaada.....	96
Figure n° 32 : Variation des composants majeurs retrouvés dans l'huile essentielle d' <i>Artemisia herba-alba</i> de la région de Bousâada.....	96
Figure n° 33 : Photo de la boîte de pétri initiale coulée avec la gélose columbia	

additionnée de 5% du sang de mouton etensemencée d'un prélèvement de la poche parodontale.....	103
Figure n° 34 : Photo de la boîte de pétri initiale coulée avec la gélose columbia additionnée de 5% du sang de mouton etensemencée d'un prélèvement de patient sain.....	103 104
Figure n° 35 : Photo d'une observation microscopique d'une flore d'un sulcus sain.....	
Figure n° 36 : Photo d'une observation microscopique d'une flore de parodontite chronique.....	104
Figure n° 37 : Identification de la souche de référence <i>P. gingivalis</i> et des souches cliniques selon leurs critères biochimiques.....	108
Figure n° 38 : Photos des bandes d'ADN obtenues sur la plaque du gel d'électrophorèse.....	110
Figure n° 39 : Spectre Maldi-tof de la souche clinique <i>Prevotella intermedia</i> avec un score de 1.846.....	113
Figure n° 40 : Spectre Maldi-tof de la souche clinique <i>Prevotella intermedia</i> avec un score de 2.104.....	114
Figure n° 41 : Spectre Maldi-tof de la souche clinique <i>Prevotella intermedia</i> avec un score de 1.966.....	115
Figure n° 42 : Spectre Maldi-tof de la souche clinique <i>Porphyromonas gingivalis</i> avec un score de 1.834.....	116
Figure n° 43 : Spectre Maldi-tof de la souche clinique <i>Porphyromonas gingivalis</i> avec un score de 1.982.....	117
Figure n° 44 : Spectre Maldi-tof de la souche clinique <i>Prevotella intermedia</i> avec un score de 1.826.....	118
Figure n° 45 : Spectre Maldi-tof de la souche clinique <i>Porphyromonas gingivalis</i> avec un score de 1.751.....	119
Figure n° 46 : Spectre Maldi-tof de la souche clinique <i>P. intermedia</i> avec un score de 2.066.....	120
Figure n° 47 : Spectre Maldi-tof de la souche clinique <i>P. intermedia</i> avec un score de 2.104.....	121

Figure n° 48 : Spectre Maldi-tof de la souche clinique <i>P. intermedia</i> avec un score de 1.921.....	122
Figure n° 49 : Arbre phylogénétique basée sur les gènes codant l'ARN 16S montrant la position de l'isolat QRY_998.16_1391.....	124
Figure n° 50 : Arbre phylogénétique basée sur les gènes codant l'ARN 16S montrant la position de l'isolat QRY_1000.16_639.....	125
Figure n° 51 : Arbre phylogénétique basée sur les gènes codant l'ARN 16S montrant la position de l'isolat QRY_997.16_654.....	126
Figure n° 52 : Arbre phylogénétique basée sur les gènes codant l'ARN 16S montrant la position de l'isolat QRY_996.16_643.....	127
Figure n° 53 : Arbre phylogénétique basée sur les gènes codant l'ARN 16S montrant la position de l'isolat QRY_995.16_937.....	128
Figure n° 54 : Photos de quelques zones d'inhibition obtenues lors de la réalisation de ce travail.....	130
Figure n° 55 : Corrélation linéaire entre les diamètres des zones d'inhibition de la croissance des 2germes et les concentrations de l'extrait aqueux (EAq) des plantes étudiées.....	133
Figure n° 56 : Effet des quatre extraits (EAq1, EAq2, EAq3, EAq4) sur l'inhibition de la croissance de <i>P. gingivalis</i> et <i>P. intermedia</i>	135
Figure n° 57 : Corrélation linéaire entre les diamètres des zones d'inhibition de la croissance des 2 germes et les concentrations de l'extrait aqueux (EAq) et de l'huile essentielle (HE) d' <i>Artemisia herba-alba</i>	144
Figure n° 58 : Effet de l'EAq et de l'HE d' <i>A. herba-alba</i> sur l'inhibition de la croissance de <i>P. gingivalis</i> et <i>P. intermedia</i>	145

Tableau n° 1 : La flore buccale en quelques chiffres.....	5
Tableau n° 2 : Teneur en composés phénoliques de quelques végétaux consommés par l'homme et leur répartition dans chaque plante.....	49
Tableau n° 3 : Principales familles de constituants des huiles essentielles et exemples de composition.....	59
Tableau n° 4 : Les caractéristiques de l'appareil FTIR utilisé.....	64
Tableau n° 5 : Composition du tampon initial.....	73
Tableau n° 6 : Programme de l'amplification de l'ADN 16S.....	73
Tableau n° 7 : Signification des valeurs de score (échantillon standard).....	76
Tableau n° 8 : Les valeurs des concentrations en PPT (mg/ml) utilisées pour la mise en évidence de l'activité antibactérienne des extraits végétaux.....	77
Tableau n° 9 : Les différentes concentrations en polyphénols totaux des extraits végétaux utilisées pour déterminer la CMI pour les deux souches <i>P. gingivalis</i> et <i>P. intermedia</i>	78
Tableau n° 10 : Les différentes concentrations en HE d' <i>A. herba-alba</i> utilisées pour déterminer l'activité antibactérienne contre les deux souches <i>P. gingivalis</i> et <i>P. intermedia</i>	78
Tableau n° 11 : Les différentes concentrations en HE d' <i>A. herba-alba</i> utilisées pour déterminer la CMI pour les deux souches <i>P. gingivalis</i> et <i>P. intermedia</i>	79
Tableau n° 12 : caractérisation physico-chimique des différentes plantes étudiées.....	82
Tableau n° 13 : Caractère organoleptique de l'HE d' <i>Artemisia herba-alba</i>	87
Tableau n° 14 : Les propriétés physico-chimiques de l'HE d' <i>Artemisia herba alba</i>	90
Tableau n° 15 : Composition de l'HE d' <i>Artemisia herba-alba</i> de la région de Biskra.....	94
Tableau n° 16 : Composition de l'HE d' <i>Artemisia herba-alba</i> de la région de Bousaada.....	97
Tableau n° 17 : Comparaison entre la composition des huiles essentielles des deux régions Biskra et Bousaada.....	101
Tableau n° 18 : Caractères biochimiques des deux souches étudiées <i>P. gingivalis</i> et <i>P.</i>	

<i>intermedia</i>	107
Tableau n° 19 : Antibiogramme des deux souches étudiées <i>P. gingivalis</i> et <i>P. intrmedia</i>	109
Tableau n° 20 : Les valeurs des diamètres d'inhibition et de la CMI obtenus en fonction des différentes concentrations des PPT des extraits végétaux utilisés sur les deux souches <i>P. gingivalis</i> et <i>P. intermedia</i>	131
Tableau n° 21 : Activité antimicrobienne de l'HE et de l'EAq d' <i>A. herba-alba</i>	142

ADN	Acide désoxyadénonucléique
ARN	Acide désoxyribonucléique
Bcl-2	B-cell lymphoma 2 (Gène)
Caco-2	Cellules d'adénocarcinome du côlon humain
CfxA	Céphalosporinase
CMI	Concentration minimale inhibitrice
COX-2	Cyclooxygénase-2
CPF	Chlopyrifos
C_{PPT}	Concentration en polyphénols totaux
CRP	Protéine C-réactive
CTD	C-terminal domain
D, d	Dilution
dATP	Désoxyadénosine triphosphate
dCTP	Désoxycytidine triphosphate.
dGTP	Désoxyguanosine triphosphate
D.I	Diamètre d'inhibition
dNTP	Désoxynucléosine triphosphate
dTTP	Désoxythymidine triphosphate;
EAq	Extrait aqueux
Eau PPI	Eau pour préparation injectable
EDTA	Ethylène diamine tétraacétate
EC	Epicatéchine
ECG	Epicatéchine Gallate
EGCG	Epigallocatechine Gallate
ESCC	Carcinome épidermoïde de l'œsophage
GC	Chromatographie en phase gazeuse
HE	Huile essentielle
H₂O₂	Eau oxygénée
Hz	Hertz
IL-6, IL-1b	Interleukines
FTIR	Infrarouge à transformée de Fourier
LPS	Lipopolysaccharides
MMP-9	Métallopeptidase 9 matricielle
MALDI	MALDI Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation
MCP-1	Protéine chimiotactique des monocytes 1
MHG	Microwave Hydrodiffusion and Gravity
MS	Spectrométrie de masse
MSP	Main Spectra Projection
AMV	Acide mévalonique
NF-κB	Nucléaire facteur- kappa B
NO	Oxyde d'azote
NS	Non significative
OTEE	Extrait éthanolique de thé oolong
PAE	Pellicule exogène aquirse
pb	Paire de bases

Liste des abréviations

PCR	Polymerase chain reaction (Réaction en chaîne par polymérase)
PM	Plantes médicinales
PPT	Polyphénols totaux
PR	Polyarthrite rhumatoïde
QS	quorum sensing
RT	Retention time
RTP	Proteinase k storage room temperature
STEP	Station de traitement des eaux potables
SV	Score value
TAE	Tris, Acétate, EDTA
TBE	Tris, Borate, EDTA
TNF-α	Facteur de nécrose tumorale- α
TOF	Temps de vol (Time of Flight)
TY	Tryptone yeast
UI	Unité internationale

Introduction

La cavité buccale abrite un des écosystèmes les plus complexes de l'organisme et représente une importante voie d'entrée d'agents responsables de maladies infectieuses (**Grenier et Mayrand, 2000 ; Bodet et al., 2007**).

Les maladies parodontales sont des maladies inflammatoires d'origine bactérienne très répandues (**Houle et Grenier, 2003 ; Anagnostou et al., 2011**), impliquant un groupe de bactéries anaérobies à Gram négatif. A la différence des gingivites, états inflammatoires réversibles, les parodontites se caractérisent par la destruction irréversible des tissus de soutien de la dent. La destruction de tissus du parodonte est le résultat d'une réponse immuno-inflammatoire faible de l'organisme contre les bactéries locales. Non traitées, les parodontites entraînent à terme une diminution du support parodontal et la perte de la dent (**Anagnostou. et al., 2011**).

Aujourd'hui de nombreux travaux reconnaissent l'influence des parodontites sur l'état de santé générale. En effet, les relations entre les parodontites, les maladies cardiovasculaires, le diabète, les naissances prématurées, les maladies respiratoires, la PR ou les cancers ont été décrites (**Anagnostou et al., 2011 ; Buxeraud, 2017**) . Ainsi, tout foyer infectieux d'origine dentaire, qui entretient une septicité buccale permanente et une inflammation chronique, peut avoir une incidence sur l'organisme, entraîner des manifestations à distance et interférer avec certaines maladies systémiques (**Buxeraud, 2017**). D'ailleurs, depuis quelques années, les liens entre maladies parodontales et maladies systémiques sont étudiés avec sérieux par la communauté scientifique (**Buxeraud, 2017**).

Des études épidémiologiques ont révélé qu'environ 10% de la population est atteinte de la forme sévère et généralisée. Les principaux agents pathogènes impliqués dans la parodontite sont : *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Tannerella forsythia*, *Corredens Eikenella* et *Treponema denticola* (**Zarco et al., 2012 ; Filoche et al., 2010; Dashiff et Kadouri, 2011**). Parmi ces microorganismes, le *Porphyromonas gingivalis* est considéré comme un agent à haut pouvoir pathogène. Aussi, le genre *Prevotella* est couramment impliqué dans presque tous les

types d'infections buccales, telles que les caries et les infections des canaux radiculaires, les maladies parodontales et péri-implantaires (**Gürsoy et al., 2017**).

Au cours de la dernière décennie et compte tenu de l'apparition de bactéries de plus en plus résistantes aux antibiotiques, les études se sont tournées vers les plantes médicinales ayant une activité bactéricide et anti-inflammatoire susceptibles de soigner ces pathologies buccales. Les plantes représentent une source très riche de composés naturels susceptibles d'avoir des activités antimicrobiennes, sachant que certaines ont été incorporées dans les produits d'hygiène buccale (**Jhajharia, et al., 2015**). Cependant, leur application en pathologie buccales est récente et reste insuffisante.

Actuellement, de nombreuses bactéries sont devenues résistantes aux antibiotiques à large spectre de l'arsenal pharmaceutique, cette résistance pose un problème majeur dans la lutte contre les agents infectieux. De plus, les antibiotiques sont inefficaces contre les maladies virales (**Billerbeck, 2007**). Aussi, la recherche d'agents anti-infectieux naturels est devenue un enjeu majeur de la recherche pharmaceutique.

Par ailleurs, l'eau, l'environnement et les aliments contaminés par des bactéries résistantes peuvent contribuer à la propagation de ces bactéries transmissibles à l'homme ou aux animaux et ont par conséquent l'objet d'une surveillance accrue (**Toitot et al., 2016**). Egalement, les résidus de médicaments peuvent agir sur les composants écologiques des sols, notamment sur la microflore. Il est ainsi possible d'affecter directement les micro-organismes de ces sols en particulier avec les résidus d'antibiotiques. En effet, ces derniers sont faiblement dégradés par les STEP, en particulier les quinolones (ciprofloxacine, norfloxacine...), les nitro-imidazoles et les sulfonamides (**Haguenoer et al., 2008**). En France, il existe 158 000 cas d'infections à bactéries multi-résistantes par an et 12 500 décès (**Toitot et al., 2016**).

Le but de notre travail de recherche est de contribuer à la prévention et au traitement des maladies parodontales par la recherche de molécules naturelles courantes non toxiques ou peu nocives pouvant être utilisées à long terme, en vue de développer la phytothérapie comme méthode alternative en médecine buccale.

Dans cette présente étude, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à l'extraction des polyphénols totaux et à l'étude de leur activité antibactérienne à l'égard de souches cliniques

isolées à partir de patients atteints de la maladie parodontale. Les quatre plantes utilisées sont trois d'origine locale et une cultivée en Chine : *Artemisia herba-alba*, *Opuntia ficus-indica*, *Phlomis crinita* et *Camellia sinensis*.

Le choix de ces plantes réside dans leur richesse en molécules bioactives dotées de plusieurs activités biologiques notamment leur pouvoir antibactérien, d'où l'importance de valoriser les plantes médicinales locales et d'exploiter leurs vertus.

Les méthodes d'extraction utilisées choisies sont la macération dans l'eau pour extraire les polyphénols totaux et l'hydrodistillation pour extraire les huiles essentielles en vue de réduire la consommation de solvants et de garantir un extrait de qualité pouvant être utilisé pour une étude clinique.

Des analyses physicochimiques et spectroscopiques ont été effectuées pour caractériser les échantillons utilisés et pour contrôler la qualité des produits obtenus (extrait aqueux et huile essentielle).

Une identification qualitative a été réalisée sur les huiles essentielles extraites par la technique GC/MS afin d'identifier leurs composants abondants responsables de leurs activités biologiques.

Les souches cliniques isolées ont été identifiées dans un premier temps par leur caractère phénotypique et dans un deuxième temps par les techniques moléculaires comme la PCR, la technique de MALDI-TOF/MS et le séquençage.

Cette thèse comporte deux grandes parties :

- Une partie bibliographique consacrée aux généralités sur la maladie parodontale, aux plantes médicinales et enfin aux molécules bioactives contenues dans ces plantes ainsi que leurs activités biologiques.
- Une partie expérimentale consacrée aux matériel et méthodes, à la discussion et à l'interprétation des résultats obtenus. Cette partie se termine par une conclusion consacrée à une synthèse des résultats acquis et les perspectives dégagées.

Chapitre 1

LA MALADIE PARODONTALE

Le microbiote oral humain est l'un des biofilms les plus diversifiés qui colonisent la cavité buccale composé de plus de 700 taxons individuels (**Frias-Lopez, 2014 ; , Acharya et al., 2017 ; , Esteban-Fernandez et al., 2017**). Les caries et les maladies parodontales, deux maladies buccales les plus répandues, sont le résultat d'une biochimie microbienne saine devenue dysbiotique en raison de mécanismes qui ne sont pas complètement compris (**Frias-Lopez, 2014**). Ce sont des cas particuliers de maladies infectieuses dans lesquelles l'origine de l'infection n'est pas un organisme exogène, mais un organisme commensal qui, en quelque sorte, surpasse et modifie les caractéristiques de la biochimie microbienne à son avantage (**Frias-Lopez, 2014**).

L'origine de la microbiologie bucco-dentaire est étroitement liée aux débuts de la microbiologie en tant que science. Antonie van Leeuwenhoek (1632-1723) a été le premier scientifique à décrire les microorganismes du biofilm oral (communément appelé plaque dentaire). À l'aide de son microscope primitif, il a pu décrire avec une grande précision un grand nombre de microorganismes de différentes formes, identifiés plus tard comme habitants communs du biofilm oral qui se développent sur les dents, également appelée plaque dentaire. En septembre 1683, Leeuwenhoek transmet à la Société royale ses observations faites à partir d'un échantillon de la plaque prélevée de la surface de ses propres dents : «je n'ai pas nettoyé mes dents pendant trois jours, puis j'ai pris le matériel qui a été déposé en petites quantités sur les gencives au-dessus de mes dents de devant. J'ai trouvé quelques animaux vivants ». Avec de simples descriptions, Antonie van Leeuwenhoek venait d'initier l'étude de l'écologie microbienne buccale en donnant une première indication de la complexité de la communauté bactérienne qui colonise notre cavité buccale. Au cours de ces dernières années, la plaque dentaire a été décrite et comparée à un biofilm qui peut contenir des bactéries, des archées, des virus et des levures. Néanmoins, la grande majorité de la biomasse buccale est d'origine bactérienne (**Frias-Lopez, 2014**).

La notion de biofilm actuelle n'est apparue qu'à la fin des années soixante-dix. Le biofilm se définit comme un film de microorganismes, d'une ou de plusieurs espèces, adhérant à une surface submergée ou soumise à un environnement aqueux. Ces cellules microbiennes se développent dans une matrice formée de biopolymères, principalement des polysaccharides et aussi des protéines et des acides nucléiques, excrétées par certains microorganismes à divers moments de leur cycle cellulaire (**Chardin et al., 2006**).

1.1. Les biofilms buccaux

Chez l'homme, la flore buccale est très complexe et diversifiée. Elle est constituée de parasites eucaryotes, de champignons et levures, de mycoplasmes et de plus de 500 espèces bactériennes. Les bactéries sont les plus abondantes, six milliards de nouvelles bactéries seraient produites en 1 ou 2 heures dans la bouche de chaque individu (Chardin et al., 2006 ; , Esteban-Fernandez et al., 2017). Ces populations qui cohabitent dans un site particulier «habitat» interagissent entre elles (antagonisme et synergisme) pour constituer une communauté microbienne (LAbbé et al., 1998).

Cette coexistence prend la forme de plaque bactérienne appelée aussi biofilm dentaire (Chardin et al., 2006).

Tableau n°1 : La flore buccale en quelques chiffres (Chardin et al., 2006)

Un individu	10 ¹³ cellules eucaryotes 10 ¹⁴ bactéries
Dans la cavité buccale	10 ¹⁴ bactéries-plus de 500 espèces différentes En 2 heures, 6 milliards de bactéries sont renouvelées En 4 heures, il a entre 2,5 x 10 ⁵ et 6,3 x 10 ⁵ bactéries par mm ² sur la dent 1 mg de biofilm dentaire = 10 ⁹ bactéries
Sur les cellules épithéliales	Face interne des joues pour une cellule: 0 à 25 bactéries Face dorsale de la langue pour une cellule: 100 bactéries

Cette diversité bactérienne nécessitera pour vivre et se développer dans ce milieu, de trouver des surfaces d'adhésions favorables. Ainsi, chaque habitat a ses critères, lesquels permettent à certaines populations de dominer sur un site et de subir sur un autre. Ces facteurs incluent les récepteurs appropriés d'attachement, la présence de nutriments essentiels et de cofacteurs de croissance, ainsi que le pH, un potentiel d'oxydo-réduction et un environnement gazeux adapté (Chardin et al., 2006).

Les surfaces dentaires et parodontales sont constamment baignées dans deux liquides physiologiques différents: La salive et le fluide gingival. L'environnement supra-gingival est baigné par la salive, tandis que l'environnement sous-gingival est baigné par le fluide du sillon gingival et la salive (Chardin et al., 2006).

Au niveau de la dent, les microorganismes s'organisent en biofilm. Le biofilm dentaire constitue un habitat important de la cavité buccale. Il s'agit d'une communauté microbienne organisée dans une matrice extracellulaire complexe composée de produits extracellulaires microbiens et de composants salivaires. Au niveau de la dent, les microorganismes s'organisent en biofilm. Le biofilm dentaire (fig. n°01) consiste en une communauté microbienne organisée dans une matrice extracellulaire complexe composée de produits extracellulaires microbiens et de composants salivaires. La composition microbienne du biofilm dentaire varie dans le temps et selon les sites. Le biofilm dentaire se développe préférentiellement sur les surfaces protégées des frictions mécaniques comme les faces proximales de dents contiguës ou l'espace sous-gingival (**Chardin et al., 2006**). Les bactéries peuvent se localiser aussi bien à la surface des dents et des cellules épithéliales que dans l'espace gingivo-dentaire ou la salive. La présence de récepteurs (adhésines) permettant l'attachement des bactéries aux diverses surfaces buccales constitue un facteur important dominant pour la colonisation des différents sites de la bouche (**LAbbé et al., 1998**).

La fixation de bactéries pionnières est l'étape initiale de la formation du biofilm dentaire. Seul un nombre restreint d'espèces bactériennes peut se fixer directement sur la PAE (pellicule exogène aquisée). Ces bactéries possèdent à leur surface des adhésines qui reconnaissent spécifiquement des récepteurs de la PAE. Elles n'assurent pas la diversité du biofilm dentaire, mais leur présence est indispensable à la fixation ultérieure d'autres espèces bactériennes.

Le biofilm dentaire est un biofilm dynamique, partiellement détruit lors du brossage des dents qui se reforme rapidement sur la PAE. Sa formation se déroule en plusieurs étapes successives illustrées sur la figure n° 1(a, b) (**Chardin et al., 2006 ; , Esteban-Fernandez et al., 2017**).

La présence d'une PAE composée essentiellement de glycoprotéines est la condition majeure à la constitution du biofilm dentaire (**Frias-Lopez, 2014**).

1.1.1. L'attachement réversible

Les streptocoques du groupe *mitis* sont souvent les organismes pionniers (**Chardin et al., 2006 ; , Willems et al., 2016**). L'adhérence résulte d'interactions physico-chimiques non spécifiques entre la bactérie et les surfaces (fig. n° 1(a)) (**Chardin et al., 2006**).

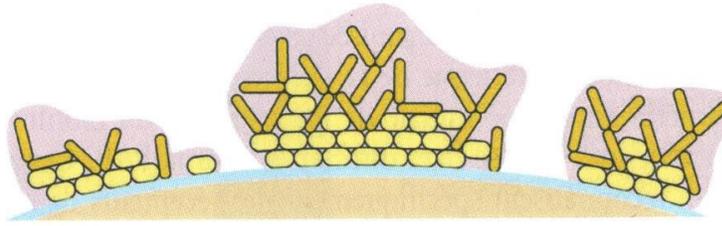
1.1.2. L'attachement irréversible

Il fait intervenir des interactions non sélectives et des interactions sélectives. Les interactions non sélectives s'établissent entre une surface bactérienne globalement chargée négativement et la PAE. En effet, l'acide lipotéichoïque des bactéries à Gram positif ou le LPS des bactéries à Gram négatif confèrent à la surface bactérienne une charge négative. Les bactéries se lient à la PAE chargée négativement par l'intermédiaire de cations divalents (notamment les ions Ca^{2+}) (Chardin et al., 2006).

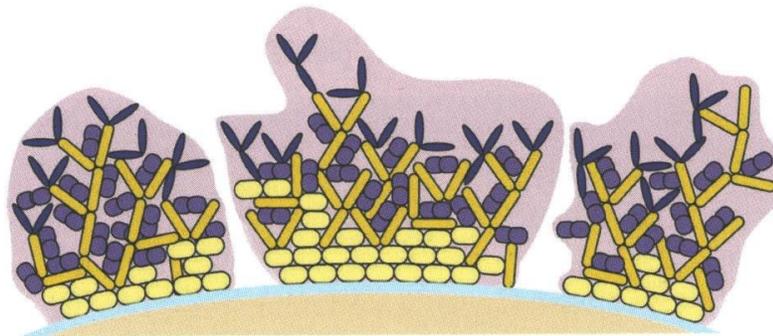
La colonisation sélective implique des interactions spécifiques ou stéréochimiques entre les adhésines bactériennes et les récepteurs de l'hôte (exemples: interaction de type ligand-récepteur et de type enzyme-substrat) (Chardin et al., 2006 ; , Willems et al., 2016). Il s'agit de liaison de haute affinité, permettant aux bactéries de se maintenir sur les surfaces dentaires pour une longue période.

1.1.3. Interactions bactériennes

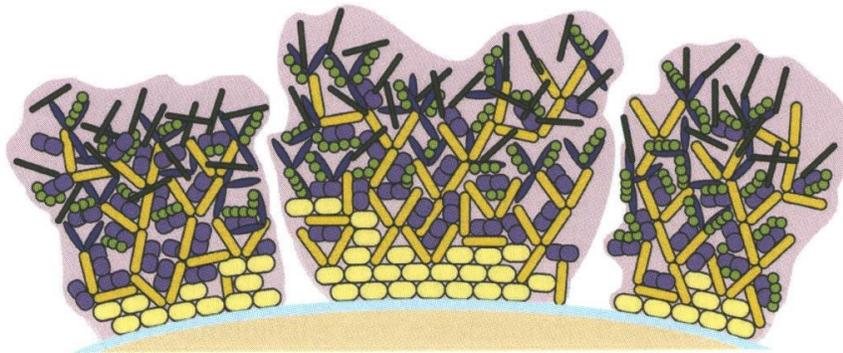
Les maladies parodontales sont essentiellement des maladies de la communauté microbienne (Kuboniwa et al., 2009). L'adhérence bactérienne (figure n° 1 (b)) correspond à la liaison entre 2 bactéries libres et la co-adhérence à la liaison d'une bactérie libre sur une autre déjà fixée. Ces reconnaissances bactérie-bactérie sont le résultat d'interactions spécifiques entre une protéine de surface d'une bactérie et le récepteur complémentaire de la bactérie «partenaire» (Chardin et al., 2006). Ces interactions entre les constituants de ces communautés et entre les communautés et les cellules et tissus hôtes sont d'une importance fondamentale pour déterminer la santé ou le statut pathologique du parodontium (Kuboniwa et al., 2009).



PHASE 1



PHASE 2



PHASE 3

Figure n° 1(a): Chronologie de la formation du biofilm dentaire de l'étape 1 à l'étape 3 (Chardin et *al.*, 2006)

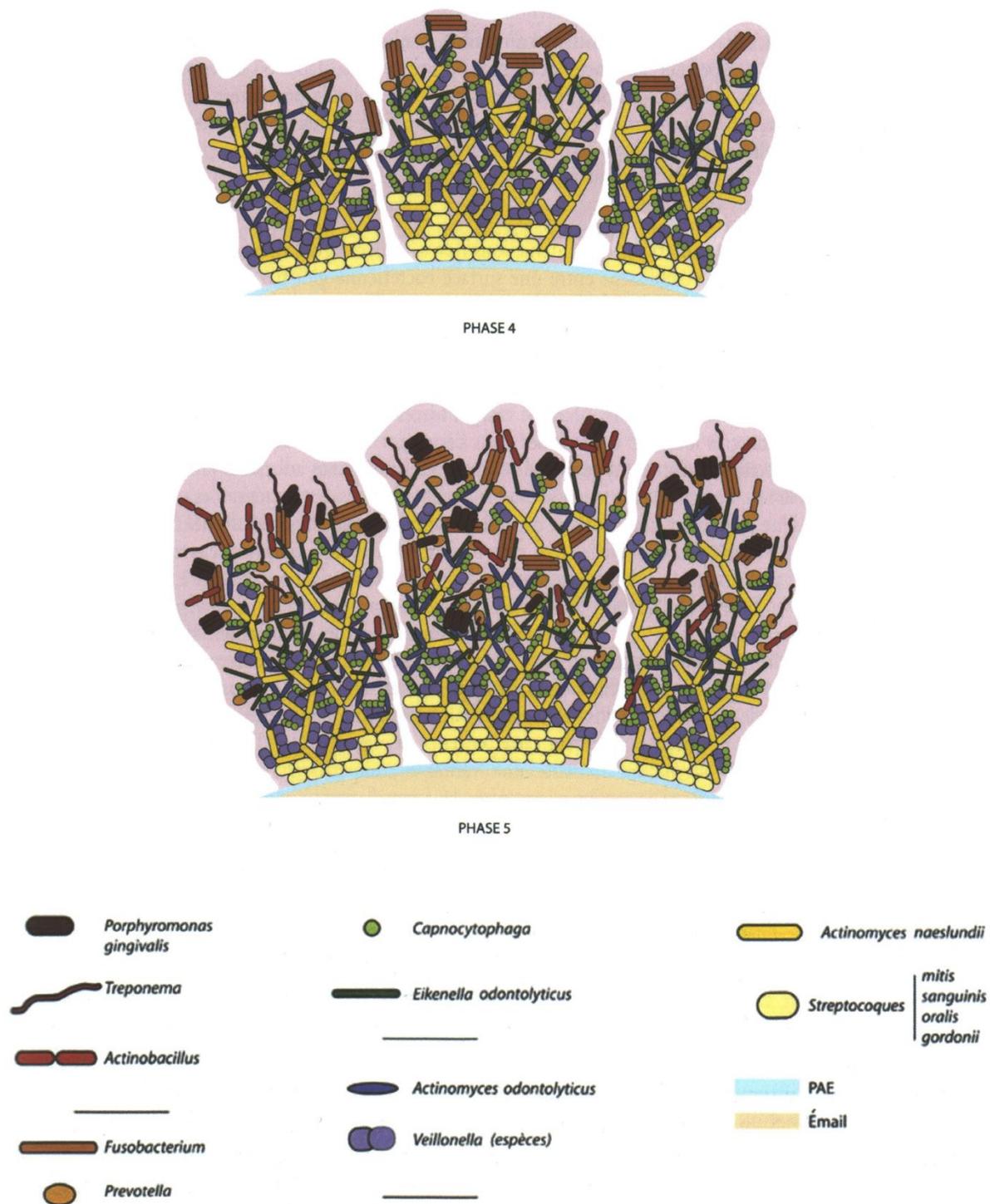


Figure n° 1(b): Chronologie de la formation du biofilm dentaire de l'étape 4 à l'étape 5 (Chardin et *al.*, 2006)

La co-adhérence (co-agrégation) peut être homotypique (interaction entre la même espèce) ou hétérotypique. Les avantages de la co-agrégation comprennent la production de matrices extracellulaires protectrices, la production d'éléments nutritifs, l'élimination des toxines, l'amélioration de la croissance (Willems et al., 2016). Ce phénomène est important dans l'épaississement du biofilm dentaire (Chardin et al., 2006). Outre les interactions physiques, les microbes utilisent la sécrétion de signaux chimiques diffusibles pour faciliter la communication entre les membres de la communauté de biofilms; il s'agit d'une véritable messagerie des bactéries appelées le quorum sensing (QS) (Willems et al., 2016).

1.1.4. Maturation du biofilm

Un biofilm oral est une communauté tridimensionnelle polymicrobienne de nombreuses espèces microbiennes, intégrées dans une matrice qui se compose de produits métaboliques microbiens et / ou de composants hôtes, comme les glycoprotéines salivaires (Willems et al., 2016).

Un biofilm oral typique commence par la formation de la pellicule émaillée couvrant la surface de la dent, résultant d'une couche de protéines et de glucides dérivés de l'adsorption sélective de composants salivaires. Les bactéries pionnières sont capables de résister à de fortes concentrations en oxygène et aux divers mécanismes d'élimination de la cavité buccale (Chardin et al., 2006). Ces espèces sont souvent du groupe streptocoques, s'attachent activement à la surface de la dent, le font via une adhésion sélective des adhésifs-récepteurs. Bien que l'adhérence initiale à la surface de la dent puisse se produire aussi vite que 5min, il faut jusqu'à plusieurs heures pour que le biofilm oral atypique se développe pleinement (Willems et al., 2016 ; , Esteban-Fernandez et al., 2017). Les espèces bactériennes (figure n° 1 (b)), «colonisateurs secondaires ou tardifs», appartiennent principalement aux genres à Gram négatif : *Fusobacterium*, *Haemophilus*, *Porphyromonas*, *Veillonella*, *Prevotella*, *Treponema*... (Chardin et al., 2006 ;, Willems et al., 2016).

L'accroissement du biofilm, conséquence de la division cellulaire et de la co-adhérence de nouvelles cellules, constitue l'étape de maturation. En réponse aux conditions physico-chimiques de l'environnement, quelques bactéries du biofilm se détachent pour coloniser de nouvelles surfaces et reformer un biofilm, ou sont dégluties (Chardin et al., 2006).

1.2. Le parodonte

Le parodonte (figure n° 2) est un organe dont la seule mission connue est de maintenir les dents solidement et durablement attachés aux maxillaires et de les mettre en relation avec le reste de l'organisme (**Charon et Mouton, 2003**). Il est composé de quatre tissus qui entourent et soutiennent la dent: la gencive, l'os parodontal, le ligament alvéolo-dentaire ou ligament parodontal ou desmodonte et le ciment. La gencive est constituée d'un tissu conjonctif recouvert d'un épithélium kératinisé ou d'épithélia non kératinisés. Le repli que forme la gencive marginale en se fixant sur la dent est appelé sillon gingivo-dentaire ou sulcus. Sa profondeur moyenne est de 2 mm. La fixation sur la dent se fait à jonction entre la couronne dentaire, la racine, l'os et la gencive, par un système d'attache épithélio-conjonctive qui évite le risque de communication entre la cavité buccale et l'os. Le sillon gingivo-dentaire est constamment baigné par un flux liquidien passant au travers de l'épithélium de jonction, le fluide gingival (**Chardin et al., 2006**). Le ligament parodontal est un tissu conjonctif dense d'origine ecto mésenchymateuse situé entre l'os alvéolaire et le ciment (**Charon et Mouton, 2003 ; , Chardin et al., 2006**). Le ciment et l'os parodontal sont des tissus conjonctifs minéralisés. Le ciment via le ligament parodontal, relie la dent à la paroi alvéolaire osseuse. Il recouvre la racine dentaire et sert de support aux fibres de collagènes desmodontales. L'os parodontal comprend des alvéoles dans lesquels sont logées les racines dentaires (**Charon et Mouton, 2003 ; , Chardin et al., 2006**).

1.3. Les maladies parodontales

Les maladies parodontales sont des maladies inflammatoires poly-microbiennes infectieuses (**Chardin et al., 2006 ; , Ahn et al., 2016**), de type mixte, à prédominance anaérobie (**Chardin et al., 2006**). Elles affectent les tissus de soutien dentaire et se caractérise par une perte d'attachement parodontal, y compris l'os alvéolaire. L'étiologie de la maladie est multifactorielle (**Winkelhoff et al., 2002 ; , Borsanelli et al., 2017**) due à un déséquilibre de l'écosystème buccal (**Chardin et al., 2006**). Ce déséquilibre dû aux variations de la physiologie de l'hôte et de plusieurs facteurs tels que des habitudes hygiéniques, facteurs génétiques et environnementaux , se traduit par un passage d'un biofilm associé à la santé à un biofilm associé à la maladie (**Frias-Lopez, 2014 ; , Esteban-Fernandez, 2017**).

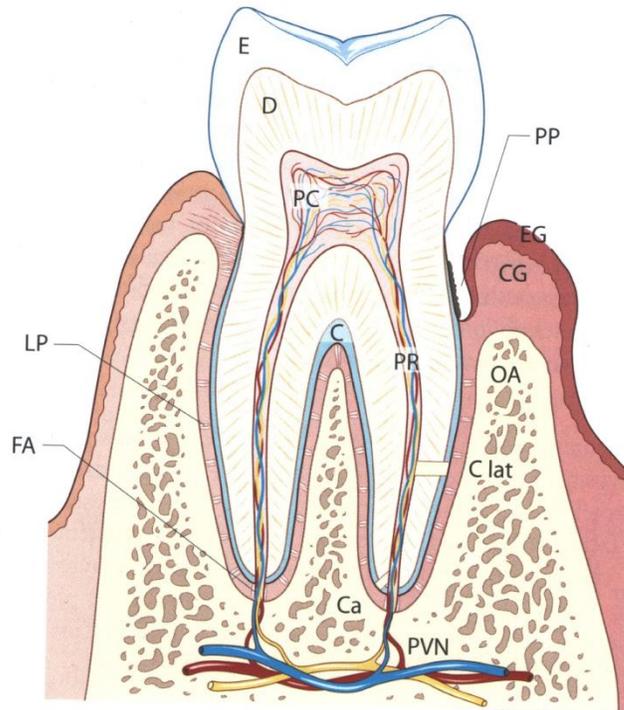


Figure n° 2 : Pathologie de la maladie parodontale. E: émail, D: dentine, PC: pulpe camérale, PR: pulpe radiculaire, LP: ligament parodontal, C: cément, FA: foramen apical, PVN: plexus vasculo-nerveux, OA: os alvéolaire, PP: poche parodontale, EG: épithélium gingival, CG: conjonctif gingival, Ca: canaux apicaux, C lat: canaux latéraux (Chardin *et al.*, 2006)

Les sites sous-gingivaux représentent une niche écologique pour de nombreux genres bactériens représentés par plus de 300 espèces. Ces espèces bactériennes cohabitent habituellement en harmonie. Cependant, lorsque certaines conditions favorisent l'émergence d'une espèce avec un potentiel pathogène, au détriment des autres membres de la communauté, les maladies parodontales font leur apparition (**Labbé *et al.*, 1998**).

Les maladies parodontales se divisent en gingivites et parodontites (**Labbé *et al.*, 1998 ; , Chardin *et al.*, 2006**).

La gingivite désigne une inflammation réversible (**Labbé *et al.*, 1998 ; , Willems *et al.*, 2016**), non spécifique des tissus mous qui entourent les dents. Elle résulte de l'augmentation du nombre de bactéries (à Gram négatif et/ou à Gram positif) présentes au niveau des sulcis entraînant une réponse inflammatoire robuste (**Chardin *et al.*, 2006 ; , Willems *et al.*, 2016**). De nombreuses perturbations internes ou externes, y compris l'hygiène buccale,

l'immunosuppression transitoire, les blessures ou les facteurs alimentaires peuvent déclencher la gingivite. Lorsqu'elle n'est pas traitée, la gingivite peut devenir chronique et évoluer en parodontite, une manifestation orale irréversible et très émouvante (**Willems et al., 2016**).

Les parodontites sont le résultat d'une réponse inflammatoire (aigüe ou chronique) des tissus plus profonds du parodonte (**Chardin et al., 2006**). Elles se manifestent par une destruction de l'ensemble des tissus de soutien de la dent incluant l'os alvéolaire et le ligament parodontal, avec formation d'une poche parodontale (**Labbé et al., 1998 ; , Willems et al., 2016**). La parodontite, est responsable de la moitié de la perte de dent chez les adultes et constitue un problème de santé publique majeur compte tenu de son incidence élevée et de son implication avec divers désordres systémiques (**Frias-Lopez, 2014**).

La maladie parodontale se développe quand l'équilibre de la communauté bactérienne sous-gingivale est rompu en faveur des bactéries parodontopathogènes, qui remplacent le microbiote commensal (**Chardin et al., 2006**). D'après certains chercheurs, les consortiums polymicrobiens perturbent l'homéostasie des tissus en manipulant les voies de signalisation de l'hôte, compromettant l'immunité innée des muqueuses. Ce déséquilibre provoque un changement dans l'abondance relative des microbes pathogènes, ce qui entraîne l'inflammation (**Willems et al., 2016**).

Ces maladies affectent plus des deux tiers de la population mondiale. La parodontite est une maladie complexe, avec de multiples facteurs causaux modulant de manière interactive et simultanée l'initiation, la progression et la gravité de son cours. Quatre principaux facteurs de risque sont reconnus aujourd'hui, le premier étant le microbiote dentaire et subgingival, en plus de la variabilité génétique individuelle, du style de vie et des facteurs systémiques. Une attention particulière a déjà été accordée à l'identification des microorganismes périodontopathiques spécifiques, car l'apparition et les caractéristiques des maladies parodontales sont étroitement liées aux changements dans l'habitat physiologique buccal (**Santigli et al., 2016**).

1.4. Les bactéries parodontopathogènes

Entre 500 et 700 taxons ont été isolés à partir de sulci gingivaux sains et/ou pathologiques. (**Chardin et al., 2006 ; , Santigli et al., 2016**). Certains seulement, seuls ou en combinaison, s'ils ont atteint une concentration critique, ont la capacité de dominer le microbiote oral (**Chardin et al., 2006**).

Des études ont confirmé la grande diversité du microbiote oral (figure n° 3) et les taxons prédominants dans des échantillons sains appartenaient à Firmicutes (genre *Streptococcus*, famille Veillonellaceae, genre *Granulicatella*), Proteobactéries (genre *Neisseria*, *Haemophilus*), les Actinobactéries (genre *Corynebacterium*, *Rothia*, *Actinomyces*), tandis que les Bacteroidetes (*Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Capnocytophaga*, *Porphyromonas*) et Fusobacteria (genre *Fusobacterium*) semblent être plus associés à la maladie (Frias-Lopez, 2014 ; , Shoji et Nakayama, 2015 ; , Esteban-Fernandez et al., 2017).

En effet, cinq complexes de bactéries sont donc associés à la maladie parodontale dans une mesure variable. Le complexe rouge, qui contient les bactéries les plus fortement liées à la parodontite, a été largement étudié (Santigli et al., 2016).

La présence du complexe rouge (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* et *Treponema denticola*) a été associé plus fréquemment aux indicateurs cliniques des maladies parodontales.

Selon Charon et Mouton, 2003, la perte d'attache serait associée à la présence de trois espèces du complexes rouge. Ce qui explique que les bactéries au sein des complexes et les complexes eux-mêmes se regroupent non au hasard mais selon des lois dont seules les interactions bactéries/bactéries et hôte/bactéries de l'écosystème parodontal peuvent rendre compte.

Il a été suggéré que toutes les bactéries associées à la parodontite ne sont pas des habitants normaux d'une dentition parodontale. En particulier, *Porphyromona gingivalis* et *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ont été rarement isolés chez des sujets sans parodontite (Winkelhoff et al., 2002). *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus*, *Fusobacterium nucleatum* et *Peptostreptococcus micros* étaient significativement plus fréquents chez les patients que chez les témoins. Les taux de probabilité les plus élevés ont été trouvés pour *A. actinomycetemcomitans* et *P. micros*, respectivement. En effet, *B. forsythi* et *P. gingivalis* sont les marqueurs bactériens les plus puissants de cette maladie (Winkelhoff et al., 2002).

Le microbiote dans les manifestations chroniques et sévères de la maladie parodontale est enrichi en bactéries anaérobies Gram-négatives. Parmi ceux, le *Porphyromonas gingivalis*, un agent pathogène oral clé qui peut envahir les cellules épithéliales et interférer avec les réponses

immunitaires de l'hôte et les mécanismes du cycle cellulaire (Gao et al., 2016). Bien que la plupart des espèces bactériennes dans la plaque sous-gingivale des patients atteints de parodontite puissent également être trouvées chez des sujets sans parodontite. *P. gingivalis* est rarement détecté chez des individus sans destruction parodontale (Winkelhoff et al., 2002).

Les bactéries impliquées dans la parodontite s'accumulent dans la plaque sous-gingivale qui comprend principalement des cellules anaérobies strictes Gram négatives. Le groupe des germes anaérobies pigmentés est fortement associé aux infections parodontales destructrices et le principal agent pathogène dans ce groupe est le *Porphyromonas gingivalis* (Winkelhoff et al., 1996 ; , Borsanelli et al., 2017). De nombreux auteurs suggèrent que cet organisme pourrait ne pas être un habitant normal d'une dentition parodontale. De plus, les espèces les plus fortement associées à la destruction parodontale étaient *P. gingivalis* et *B. forsythus* (Winkelhoff et al., 2002).

Cela montre que la simple présence de *P. gingivalis* dans la zone sous -gingivale ne conduit pas nécessairement à une infection parodontale destructrice et confirme l'hypothèse selon laquelle les pathogènes parodontaux sont essentiels à la pathogenèse de la parodontite mais pas assez pour déclencher la destruction du parodonte. Apparemment, un hôte sensible et / ou la présence d'autres microorganismes pathogènes sont nécessaires pour initier la maladie (Winkelhoff et al., 2002).

Des agents pathogènes parodontaux putatifs autres que *P. gingivalis* pourraient être détectés et leur association avec la parodontite a également été établie. À l'exception de *C. rectus*, toutes les bactéries cibles ont été positivement associées à une parodontite avec des rapports de chances allant de 3.1 pour *A. actinomycetemcomitans* à 10.4 pour *B. forsythus*. Des rapports inférieurs, mais significatifs, ont également été trouvés pour *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*, *F. nucleatum* et *P. micros* (Winkelhoff et al., 2002).

Fusobacteriumnucleatum, une bactérie anaérobie stricte gram-négative, joue un rôle majeur dans la formation du biofilm périodontique comme un pont entre les colonisateurs pionniers et tardif. Certes *P. intermedia* est couramment impliquée dans presque tous les types d'infections buccales, telles que les caries, les infections des canaux radiculaires et les maladies parodontales (Santigli et al., 2016 ; , Gürsoy et al., 2017).

Le rôle probable des spirochètes dans l'étiologie des maladies parodontales a été reconnu depuis plus d'un siècle. Très probablement, les spirochètes étaient les premiers ou parmi les premiers agents à causer ces infections puisque la flore sous gingivale de sujets atteints de parodontite sévère est caractérisée par la présence d'un nombre important de Spirochètes contrairement aux sites parodontaux des sujets sains (**Haffajee et al., 2005**).

P. gingivali est un agent pathogène parodontal qui réside dans une communauté multispécifique de biofilm microbiologique connue sous le nom de plaque dentaire (**Kuboniwa et al., 2009**). C'est une bactérie asaccharolytique, qui utilise des acides aminés ou des peptides dégradés dérivés de protéines comme sources d'énergie. Ces acides aminés et peptides peuvent être générés via l'action des protéases bactériennes sur les protéines sériques et tissulaires (**Houle et Grenier, 2003**). En effet, les protéases produites par cette bactérie, sont impliquées dans la nutrition mais également dans l'adhérence et la destruction des tissus parodontaux (**Bodet et al., 2006**). Ces protéases sont des protéines de virulence « gingipaines ». Les gingipaines sont sécrétées via le système de sécrétion de type IX (T9SS) récemment identifié. Ces protéines de virulence ont une région de domaine C-terminal conservée (CTD : C-terminal domain), qui est utilisée comme signal de sécrétion (**Shoji et Nakayama, 2015**).

1.4.1. *Porphyromonas gingivalis*

Bien que colonisateur tardif ou secondaire de la cavité buccale, *P. gingivalis* reste l'agent causal majeur dans l'initiation et la progression de la maladie parodontale (**Slots and Ting, 1999** ; , **Meuric et al., 2007** ; , **Esteban-Fernandez et al., 2017** ; , **Jang et al., 2017**). En effet, cette bactérie est le plus souvent le membre dominant de la flore cultivable des poches parodontales en phase active de destruction. L'arsenal de facteurs de virulence dont il dispose, en particulier sous forme d'enzymes protéolytiques, est important et lui permet de coloniser l'espace sous-gingival, de perturber le système de défense de l'hôte, d'envahir et de détruire les tissus parodontaux (**Bodet et al., 2007**). Les attributs majeurs du pouvoir pathogène de *P. gingivalis* sont les adhésines, le LPS, les enzymes, en particulier protéolytiques, et les vésicules (**Charon et Mouton, 2003**).

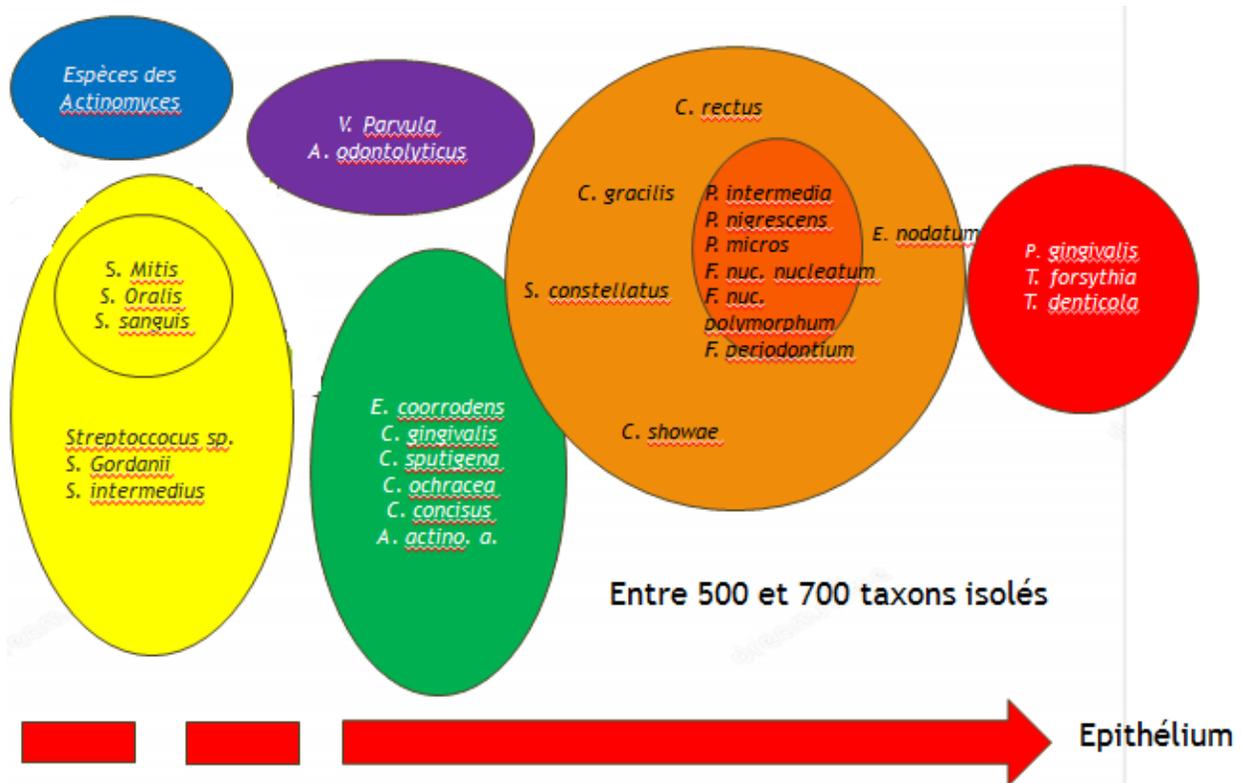


Figure n° 3 : Différentes espèces bactériennes provenant d'échantillons de plaques sous-gingivales apparaissent ensemble formant différents groupes bien définis. La figure montre les différents complexes de bactéries qui apparaissent en association avec une plaque sous-gingivale. Le complexe rouge apparaît toujours associé à une parodontite sévère et non à des échantillons sains. La flèche rouge montre la succession de complexes de santé à la maladie ainsi que leur emplacement dans la poche parodontale (Frias-Lopez, 2014).

1.4.2. *Prevotella intermedia*

La présence en grand nombre de *P. intermedia* a été mise en évidence tout particulièrement dans la gingivite ulcéronecrotique, les gingivites inflammatoires et différentes parodontites (**Charon et Mouton, 2003**). Elle exprime des facteurs de virulence puissants tels que la collagénase, la protéinase, l'endotoxine, les hémolysines, l'invasion cellulaire et le facteur inhibiteur des fibroblastes et est fréquemment associés à la parodontite chez l'homme et chez plusieurs autres espèces (**Borsanelli et al., 2017**).

1.5. Les maladies systémiques liées à la parodontite

La parodontite est une maladie à médiation inflammatoire qui a également de nombreuses corrélations avec l'obésité, l'hypertension artérielle, le diabète et les maladies cardiaques (**Simpson et Thomas, 2016**) (figure n° 4 et n° 5).

Les poches profondes observées dans la parodontite représentent de véritables réservoirs de bactéries permettant à ces dernières et à leurs produits, comme le lipopolysaccharide (LPS), d'entrer dans le flux sanguin. Ainsi, l'agression bactérienne des tissus du parodonte entraîne une réponse immunitaire pro-inflammatoire locale et, dans des cas extrêmes, peut entraîner une bactériémie ou une septicémie. Cette réponse immuno-inflammatoire locale est à l'origine de la libération de nombreux médiateurs inflammatoires produits dans les tissus parodontaux : les cytokines pro-inflammatoires, les chimiokines, la protéine C-réactive (CRP), les protéases extracellulaires bactériennes spécifiques, telles que les PAD (peptidyl arginine deiminase) et les Arg- gingipainés (RgpA et RgpB). Une fois libérés, ces différents médiateurs agissent non seulement au niveau des tissus parodontaux, mais peuvent également être disséminés sur l'ensemble de l'organisme, générant ainsi des perturbations systémiques (**Willems et al., 2016**).

La PR (polyarthrite rhumatoïde) a été associée à la maladie parodontale et plus spécifiquement à la capacité de *P. gingivalis* (d'induire une citrullination de divers protéines par l'intermédiaire des enzymes PAD) à désaminer les protéines hôtes par l'intermédiaire de l'activité PAD extracellulaire. Cela conduit directement à la production d'auto anticorps antiprotéines citrullinées (ACPA) (**Willems et al., 2016**). Une corrélation a bien été retrouvée entre un taux élevé d'anticorps anticitrulline et l'incidence des parodontites associées à une PR. Ces anticorps formeraient des complexes immuns au sein des articulations, qui seraient à l'origine des atteintes articulaires. Les parodontites inductrices de citrullination pourraient avoir une place dans l'étiologie de cette maladie (**Buxeraud, 2017**).

Des études épidémiologiques ont démontré que les maladies parodontales et la perte de dent sont associées de façon significative à plusieurs cancers tels que le cancer de la bouche, le cancer gastrique et le cancer du pancréas et peuvent même concerner la survie (**Gao et al., 2016**).

L'évasion immunitaire médiée par *P. gingivalis*, l'inhibition de l'apoptose, la conversion des carcinogènes, l'induction de MMP-9 (Matrix metallopeptidase 9) et la dysbiose du microbiote oral ont toutes été considérées comme des mécanismes pro-tumorigènes dans le contexte du

carcinome épidermoïde oral (**Gao et al., 2016**). D'après ces mêmes auteurs, étant donné que les cellules squameuses œsophagiennes sont histologiquement similaires aux cellules squameuses orales et que l'infection œsophagienne résultant de la niche orale est hautement plausible, ils ont émis l'hypothèse que *P. gingivalis* pourrait être associé à ESCC (Carcinome épidermoïde de l'œsophage). *P. gingivalis* a été détecté dans une muqueuse œsophagienne cancéreuse et adjacente, mais pas une muqueuse saine. Cela fournit la première preuve directe que l'infection par *P. gingivalis* pourrait être un facteur de risque nouveau pour ESCC et pourrait également servir de biomarqueur pour le pronostic de ce cancer répandu (**Gao et al., 2016**).

Les bactéries buccales ont également été impliquées dans l'apparition de maladie respiratoire aiguë. Les gingipains libérés par *P. gingivalis* sont essentielles pour les symptômes cliniques de la pneumonie induite par aspiration de cette bactérie. Bien qu'il existe un lien apparemment transparent entre la dysbiose orale et plusieurs maladies systémiques, les mécanismes exacts, les facteurs prédisposants et les relations cause-effet demeurent clairement définis (**Willems et al., 2016**).

Des similitudes dans la diversité microbienne des poches parodontales et des plaques athéromateuses de patients atteints de maladies cardiovasculaires ont été trouvées, ce qui indique que les agents pathogènes parodontaux essaient progressivement de la cavité buccale vers d'autres sites biologiques éloignés, entraînant l'apparition de l'athérosclérose (**Willems et al., 2016**).

Des abcès du cerveau ont été observés suite à une bactériémie d'origine dentaire. De plus, il a été conclu que la maladie parodontale est un facteur de risque des accidents vasculaires cérébraux (**Chardin et al., 2006**).

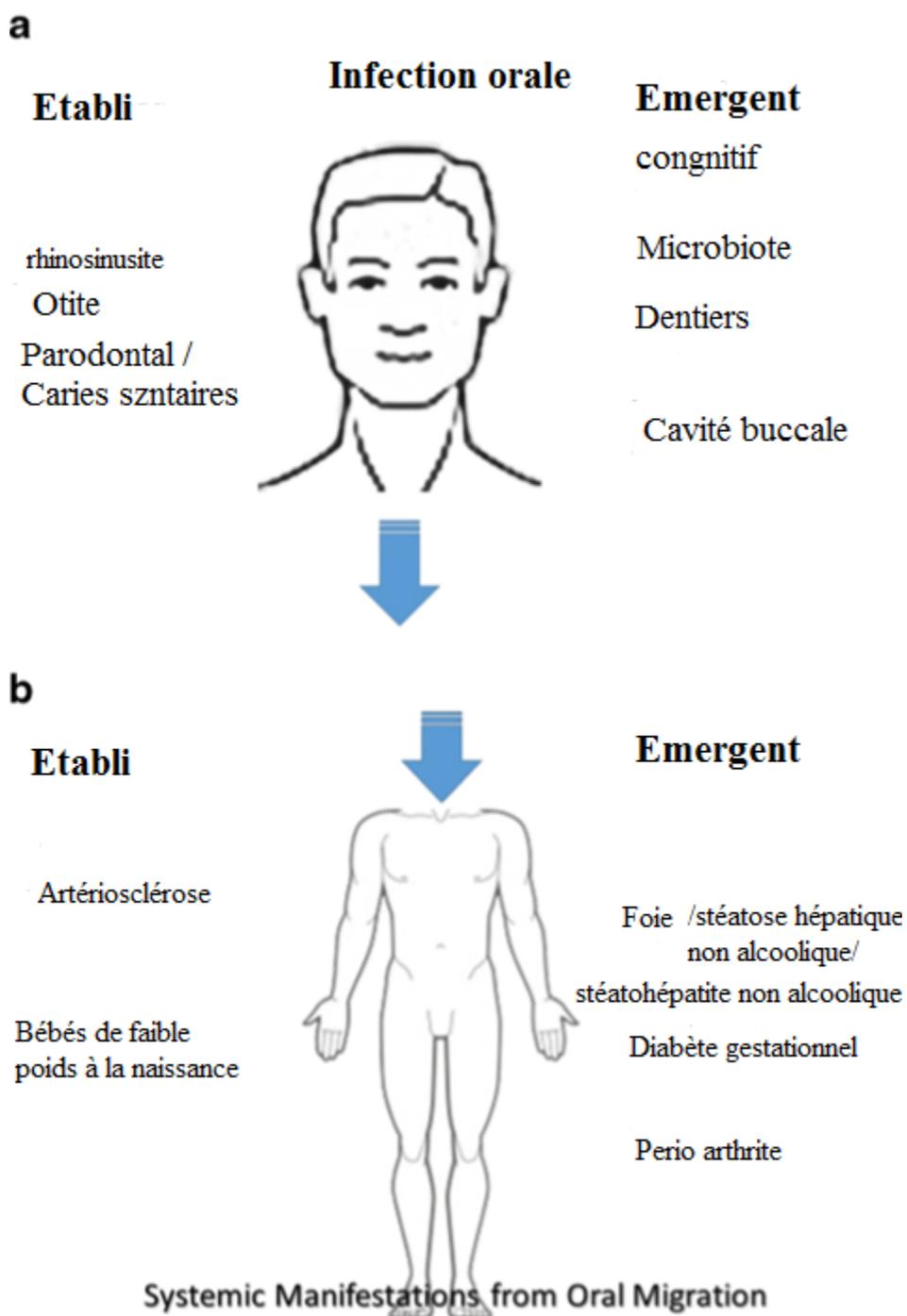


Figure n° 4 : 4 a. Infections orales et Fig. 4b: manifestations du système par la migration orale (Simpson et Thomas, 2016).

La maladie parodontale

Chapitre 1

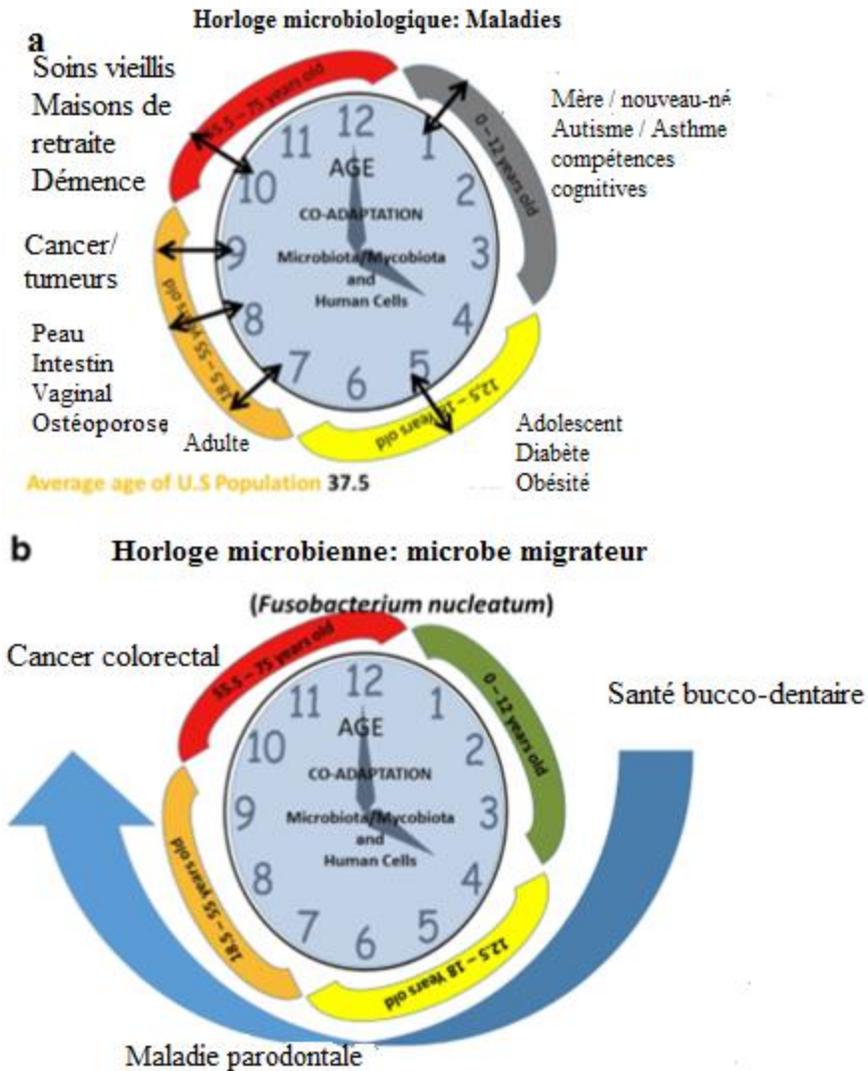


Figure n° 5 : a : Une. Horloge microbienne: maladies et b Horloge microbienne: microbe migratoire (Simpson et Thomas, 2016).

Chapitre 2

LES PLANTES MÉDICINALES

Avec des connaissances scientifiques de plus en plus croissantes, à la recherche de suppléments de santé plus sûrs, potentiels et nouveaux, les scientifiques réorientent leurs intérêts de recherche pour explorer les ressources naturelles, à savoir les plantes médicinales et les composés dérivés de plantes (Saeed et al. 2017). Cependant, malgré les progrès réalisés par la médecine moderne, la phytothérapie reste un moyen de soin largement utilisé par l'homme, voire l'unique moyen pour certains autochtones et communautés vivant dans quelques pays en voie de développement, qu'il s'agisse de maladies bénignes (rhume ou toux) ou plus graves (asthme, tuberculose ou malaria) (Hadj-Seyd et al., 2016).

En effet, ces plantes qui sont largement utilisées dans la médecine traditionnelle et facilement accessibles, représentent une alternative peu coûteuse et peuvent être efficaces contre différentes pathologies. Elles constituent une source intarissable de substances qui peuvent être utilisées dans la formulation de nouveaux agents antibactérien et antifongique. Actuellement, malgré le progrès de la pharmacologie, l'usage thérapeutique des plantes médicinales est, incontestablement, présent dans certains pays du monde notamment, les pays en voie de développement. De ce fait, il existe environ 500 000 espèces de plantes sur terre, dont 80 000 sont dotées de propriétés médicinales (Sekkat et al., 2015).

Dans ce présent travail, nous nous sommes intéressés à quatre plantes dont trois sont d'origine locale et une cultivée en Chine.

2.1. *Artemisia herba-alba* (armoise blanche)

Noms communs: thym des steppes, semen contra de barbarie;

Noms vernaculaires : chih-labyadh, chih-lahmar, chih-azga, chiha, alala, ifsi, seri, abelbel, azzere, zezzeri (Ali-delille, 2010).

2.1.1. Classification

Phylum : Angiospermeae.

Sous-phylum : Dicotylédone

Ordre : Gampanulatae

Famille : Asteraceae

Sous-famille : Asterioideae

Tribu : Anthemideae

Sous-tribu : Artemisiinae

Genre : *Artemisia*

Espèce : *herba-alba* (Mehani et al., 2016)

L'Armoise blanche (*Artemisia herba-alba*) « Chih » (figure n° 6) fait partie du genre *Artemisia* qui regroupe entre 400 et 500 espèces (Belhattab et al., 2014 ; , Bourgou et al., 2017), réparties sur les cinq continents. Cette plante est l'une des espèces qui sont largement utilisées en médecine classique (Zaim et al., 2012 ; , Bourgou et al., 2017).

Artemisia herba-alba Asso communément connue sous le nom de l'absinthe blanche ou l'absinthe du désert est un arbuste nain grisâtre aromatique originaire de l'Europe, du Sud-Ouest, de l'Afrique du Nord, de la péninsule arabique et de l'Asie occidentale (Belhattab et al., 2014). Elle est rencontrée dans tout le pourtour méditerranéen et se développe fréquemment dans les steppes argileuses, les pâturages rocaillieux et terreux des plateaux des basses montagnes des régions sèches et généralement dans les zones à bioclimats aride et semi-aride à variantes chaude, tempérée et fraîche au niveau des étages de végétation thermo-méditerranéen et méso-méditerranéen (Ghanmi et al., 2010).



Figure n° 6 : Photo de la plante *Artemisia herba- alba*

C'est une plante steppique, très répandue sur les hauts plateaux et le Sahara. Elle se présente sous la forme de buissons très ramifiés de 30 à 50 cm de hauteur (Bourgou et al., 2017). Ses feuilles

sont blanches duveteuses, ainsi que les rameaux très découpés, capitules ovoïdes à involucre scarieux comportant deux à quatre fleurs par capitule. Le fruit est un akène oblong à divisions longues étroites et espacées. Son odeur est très forte, aromatique, d'une saveur chaude et amère (Ali-delille, 2010).

2.1.2. Les principaux constituants bioactifs d'*A. herba-alba*

Les principaux constituants de la plante *A. herba-alba* sont des flavonoïdes comme l'astragaline et l'eupatiline et les composants volatils qui constituent les huiles essentielles de cette plante. Ces derniers sont des lactones de sesquiterpène, du camphre, du 1,8-cinéole, du p-cymène, de la dovanone, du cineolthujanebornane, du pinane, des α et des β -thujones, un dérivé de chrysanthényle (Zaim et al., 2012 ; , Qnais et al., 2014 ; , Bourgou et al., 2017). Les études phytochimiques de la plante *A. herba-alba* ont révélé également la présence de la santonine, les coumarines, la quercétine-3'-glucoside, la quercétine-3-O -rutinoside, 5,4'-dihydroxy-6,7,3'-triméthoxyflavone, dinatin (4', 5,7-trihydroxy-6-méthoxyflavone) et skrofulein (4', 7-dihydroxy-6,7'-diméthoxyflavone) (Qnais et al., 2014 et Mehani et al., 2016 ; , Bourgou et al., 2017).

De nombreux travaux de recherches, ont étudié la composition chimique de l'HE de cette plante et ont révélé l'existence d'au moins sept chémotypes de l'huile d'armoise récoltée au Maroc. Par contre, la composition de l'huile de cette espèce provenant de différentes régions de l'Algérie a été utilisée pour caractériser un chémotype différent de celui trouvé au Maroc.

Plus tard, des chercheurs ont analysé par GC-MS une huile obtenue à partir de plantes prélevées dans la province de Madrid et ont constaté que le camphre, le 1,8 cineole, un sesquiterpène et l' α -terpineol étaient les principaux constituants (Salido et al., 2004). Plus récemment, un autre groupe de recherche a étudié la composition d'huile d'un échantillon d'*A. herba-alba ssp. Valentina* récolté à Jaén province pendant la période de floraison complète. Sa composition était dominée par le sesquiterpène davanone et le monoterpène p-cymène, le 1,8-cinéole, la chrysanthénone, l'acétate de cis-chrysanthényle, le c-terpinène, le myrcène et le camphre (Salido et al., 2004).. En outre, un nombre appréciable de lactones de sesquiterpène ont été isolés chez *A. herba-alba* espagnol (Salido et al., 2004).

2.1.3. Domaine d'application de la plante *Artemisia herba-alba*

L'armoise blanche a été utilisée, tout d'abord, comme aromatisant dans le thé et le café, puis elle est devenue une panacée dans la médecine traditionnelle arabo-musulmane. Traditionnellement utilisée pour traiter les désordres gastriques ainsi que pour son activité antihelminthique (**Bezza et al., 2010 ; , Bourgou et al., 2017**). C'est une nourriture essentielle pour les animaux fourragers, très appréciés par le bétail comme pâturage d'hiver (**Mehani et al., 2016**).

En effet, Les infusions de ces espèces ont été utilisées comme analgésique, antispasmodique, antidiarrhéique ou comme agent diurétique, tandis que plusieurs extraits et huiles essentielles de ces plantes ont montré des activités biologiques, telles que l'activité antimicrobienne, antioxydante, anti-inflammatoire et insecticide (**Zaim et al., 2012 et Mehani et al., 2016**).

De plus, certaines espèces du genre sont couramment utilisées pour le traitement de certaines maladies telles que le paludisme, l'hépatite, le cancer et les infections par des champignons, des bactéries et des virus (**Bezza et al., 2010 et Mehani et al., 2016**).

L'armoise est également utilisée comme remède contre la toux, les blessures externes, les chutes de cheveux et la jaunisse. On a également signalé que l'extrait des feuilles de cette espèce peut être utilisé comme médicament antidiabétique (hypoglycémiant) et sédatif. Les activités leishmanicides, antipyrétiques, anti-alléopathique et antioxydantes (**Qnais et al., 2014 ; , Bourgou et al., 2017**). Récemment, les activités neurologiques d'un extrait éthanolique et de certains flavonoïdes d'*A. herba-alba* ont été démontrés. Les activités hémolytiques des venins de vipères et de scorpions ont pu être inhibées par un extrait aqueux d'*A. herba-alba* (**Qnais et al., 2014**).

Aussi, l'HE contenue dans les feuilles du genre *Artemisia* est connue pour ses propriétés régulatrices du cycle menstruel et comme remède de beaucoup de maladies telles que le diabète, la bronchite, les abcès et la diarrhée (**Ghanmi, 2010**).

Ces huiles ont de nombreuses propriétés thérapeutiques. En phytothérapie, elles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine fongique, contre des dermatophytes et contre les maladies d'origine bactérienne (**Bezza et al., 2010 et Mehani et al., 2016**).

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*A. herba-alba* a fait l'objet de nombreux travaux de recherche. Ces derniers ont révélé que les composants d'huile sont efficaces contre les souches Gram positives comme *S. aureus* ATCC25923, *M. luteus* NCIMB8166, *B. cereus* ATCC

11778 et *E. faecalis* ATCC29212 et les bactéries Gram négatives telles que, *E. coli* ATCC 35218 et *S. typhimirium* NRLB 4420 (Mighri, 2010).

2.2. *Opuntia ficus indica* (Figuier de barbarie)

Noms communs: Oponce, figuier d'Inde, cactus, raquette et nopal

Noms vernaculaires : Hendi, kermous en neçara, seurti, sobbaira, troumoucht, akarmous, amizzour (raquette) (Ali-delille, 2010).

2.2.1. Classification

Règne : Plantae

Sous-Règne : Tracheobionta

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Sous-classe : Caryophyllidae

Ordre : Caryophyllales

Famille : Cactaceae

Genre : *Opuntia*

Nom binomial : *Opuntia ficus-indica*

La plante *Opuntia ficus-indica* (OFI) (figure n° 7) pousse dans toute l'Algérie (Chougui et al., 2013), elle peut atteindre 3 mètres de haut. La base âgée est plus ou moins cylindrique et lignifiée, portant une suite de «raquettes» de plusieurs décimètres de long et articulées les unes sur les autres, de forme ovée, oblongue (cladodes). Les aréoles sont espacées et porteuses de poils irritants et d'épines courtes. Les fleurs s'insèrent sur le bord supérieur des cladodes. Elles portent de nombreux sépales gras et nombre de pétales ovales, pointus de couleur jaune vif.

L'ovaire ou le fruit à paroi extérieure épaisse, coriace, fortement garnie d'aréoles à poils irritants accrescents en fruit. Celui-ci est sucré et comestible une décortiqué. La saveur de la fleur est astringente (Ali-delille, 2010). Cette plante présente des adaptations morphologiques et physiologiques lui permettant de résister à la sécheresse, aux chaleurs torrides, aux vents violents aux tempêtes de sable et au sirocco (Hadj Sadok et al., 2008). Des propriétés offrant une meilleur adaptation aux conditions arides et semi-arides (De Leo et al., 2010 et Aguirre et al., 2013, ; Abdel-Hameed et al., 2014) et une culture dans les régions sèches (Alimi et al., 2013).



Figure n° 7 : Photo de la plante *Opuntia ficus-indica* (Corsan, 2008)

Plusieurs cultivars se trouvent dans le bassin méditerranéen (Chougui et al., 2013 ; , Petruk et al., 2017 ; , Smida et al., 2017). Ce genre est endémique en Amérique (Abdel-Hameed et al., 2014 ; , De Santiago et al., 2017) et jusqu'à maintenant 377 espèces ont été reconnues. 104 ont été sauvages au Mexique et 60 sont endémiques dans ce pays. Dans certains pays, certaines espèces de famille de cactaceae sont utilisées pour la consommation humaine en raison de leur valeur hautement nutritive. Le cactus est largement distribué au Mexique (Petruk et al., 2017 ; , Bakour et al., 2017 ; , Volpe et al., 2017 ; , Adli et al., 2017) et a été introduit en Afrique du Nord au 16ème siècle (Abdel-Hameed et al., 2014). *Opuntia ficus indica* a été également introduite en Chine auprès de Milpa Alta du Mexique en 1998 et principalement cultivée dans la province de Chine de Hainan (Zhong et al., 2010; Alimi et al., 2013).

Plus de 1500 espèces de cactus (famille des cactaceae) sont dans le genre *Opuntia* et beaucoup d'entre elles produisent des fruits comestibles et très favorisés. C'est une baie, composée d'un péricarpe épais avec plusieurs fissures de petits pickles, violet rougeâtre, jaune ou blanc, avec une pulpe sucrée (Abdel-Hameed et al., 2014).

2.2.2. Les principaux constituants bioactifs d'*Opuntia ficus-indica*

Le cactus est riche en composés nutritionnels tels que l'acide ascorbique (De Leo et al., 2010), les saponines, les polyphénols, les flavonoïdes, les tanins composés, la vitamine C, les polypeptides, les acides gras, le glutathion et les huiles essentielles (Park et Chun, 2001 , Hadj Sadok et al., 2008 ; , Ncibi et al., 2008 ; , Zhong et al., 2010; Alimi et al., 2013 ; , De

Santiago et al., 2017). La présence de chlorophylle et une importante teneur en caroténoïdes ont été également signalées (**Hadj Sadok et al., 2008**). Sur la base de l'analyse HPLC-PDA-ESI-MS / MS, sept composés ont été identifiés comme les dérivés glycosylés de kaempferol, quercétine et isorhamnetine (**De Leo et al., 2010 ; , De Santiago et al., 2017**), quercetin 3-methyl (**Hfaiedh et al., 2008**). En effet, les graines d'*Opuntia sp* se révèlent riches en polyphénols, flavonoïdes et tanins (**Chougui et al., 2013**), les acides gras polyinsaturés et les vitamines (**Chougui et al., 2013**). La concentration de ces molécules étant toujours plus élevée en graines, que dans la pulpe de fruit (**Chougui et al., 2013**).

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse de l'huile de graines a montré des pourcentages élevés d'acide linoléique dans quatre variétés allant de 58% à 63% (**Chougui et al., 2013**).

Egalement, La quantité totale de flavonoïdes de fleurs d'*O. ficus-indica* était de 81,75 mg / 1 g de matière végétale fraîche, le 3-O-robinobioside isorhamnetin étant le composant principal (52,22%). La composition des volatils de la plante a été également caractérisée et un total de 18 composants ont été identifiés. Les principaux constituants étaient le germacrène D (12,6%), le 1-hexanol (12,3%), le n-tétradécane (9,1%) et le décanal (8,2%).

La composition de monosaccharide neutre du polysaccharide d'*O. ficus-indica* de Chine était le ramnose, l'arabinose et le glucose (**Zhong et al., 2010**). De même, *O. ficus-indica* de l'Arabie Saoudite contient du glucose, sucrose et fructose (**Abdel-Hameed et al., 2014**).

Les poires épineuses sont également riches en composés antioxydants comme les phénoliques, les flavonoïdes, la bêtaxanthine et la bêtacyanine (**Alimi et al., 2013**).

En outre, les composés phénoliques et les sucres retrouvés dans le jus de la peau et de la pulpe des deux cultivars de cactus croissant dans le gouvernorat de Taif sont les suivants: l'acide gallique, catéchine, rutine, glucose et fructose (**Abdel-Hameed et al., 2014**).

En effet, le jus de cladode contient une grande variété de composés avec des activités antioxydantes telles que les polyphénols, la vitamine C et E, le bêta-carotène, le glutathion, etc. (**Hfaiedh et al., 2008**).

2.2.3. Domaine d'application de la plante *Opuntia ficus-indica*

Le cactus, *Opuntia spp.* est utilisé dans la médecine traditionnelle et comme source de nutriments végétaux (**Hfaiedh et al., 2008 ; Chougui et al., 2013 ; , Smida et al., 2017 ; , Adli et al.,**

2017) dans de nombreux pays. Il s'agit d'une excellente source d'oligoéléments naturels qui peuvent améliorer la santé humaine et la nutrition. Les extraits de cactus ont montré des activités anti-tumorales et antioxydantes (Hfaiedh et al., 2008, Smida et al., 2017).

En plus d'être consommés comme aliments ou boissons, la plupart des plantes des cactus ont été utilisées comme médicaments, et, dans les temps modernes, elles ont également été préparées commercialement sous forme de gélules, de boissons, de pilules ou de poudres (Abdel-Hameed et al., 2014). Le cactus de figuier a une distribution mondiale et est utilisé pour la production de fourrage (Volpe et al., 2017 ; , Adli et al., 2017).

Les Mexicains ont utilisé les feuilles et les fruits d'*Opuntia* pour leurs bénéfices médicinaux, comme pour le traitement de l'artériosclérose, du diabète, de la gastrite et de l'hyperglycémie. Les propriétés antioxydantes des composés phénoliques dans les plantes de poires de cactus en font un produit important pour protéger la santé humaine des maladies dégénératives telles que le cancer, le diabète, l'hypercholestérolémie, l'artériosclérose ou les maladies cardiovasculaires et gastriques (Abdel-Hameed et al., 2014).

O. ficus-indica est dotée de propriétés anti-inflammatoire, hypoglycémiant, cicatrisant, antioxydant, anticancéreux, neuroprotecteur, hépatoprotecteur, antiprolifératif, analgésique, antiviral, etc. (Park et Chun, 2001 ; , Hadj Sadok et al., 2008, ; Ncibi et al., 2008, ; Zhong et al., 2010, ; Aguirre et al., 2013, ; Bargougui et al., 2014 ; , Petruk et al., 2017).

Les sous-produits d'*Opuntia ficus-indica* représentent une bonne source d'antioxydants naturels avec des applications possibles dans les industries alimentaires, cosmétiques ou pharmaceutiques. Ces activités sont dues à la présence de composés phénoliques (Aguirre et al., 2013 ; , Petruk et al., 2017).

Les tiges par exemple, ont été utilisées pour les plaies, les œdèmes et l'indigestion (Park et Chun, 2001). L'extrait méthanolique des tiges d'*Opuntia ficus-indica* et ses fractions n-hexane et acétate d'éthyle ont montré une activité significative de cicatrisation lorsqu'on les administre par voie topique chez le rat (Park et Chun, 2001).

Les cladodes d'*Opuntia* sont également valorisés dans l'industrie cosmétique, des adhésifs, du papier et du caoutchouc. Le suc extrait par pression à partir des cladodes est conseillé pour le traitement du foie (Ncibi et al., 2008, ; Hadj Sadok et al., 2008), des rhumatismes, du scorbut

et des maladies du rein. Il a aussi un rôle hypoglycémiant et hypocholestérolémiant (**Hadj Sadok et al., 2008 ; Bargougui et al., 2014 ; Bakour et al., 2017**).

Les extraits de cladodes et les fruits d'*O. ficus-indica* ont montré une activité antileishmaniale importante contre une faible activité trypanocide (**Bargougui et al., 2014**).

Ces fruits sont dotés également de propriétés anti-inflammatoire, antioxydante, (**Zhong et al., 2010**), anticancéreuse, neuroprotectrice, hépatoprotective, antiproliférative, analgésique et antivirale. Plus encore, *O. ficus-indica* peut être utilisée pour le traitement de la gastrite, de l'hyperglycémie, de l'artériosclérose, du diabète et de l'hypertrophie de la prostate (**Ncibi et al., 2008**).

La partie comestible du fruit contient un nombre relativement important de graines, cette quantité pouvant aller de 30% à 40% sur une base de poids sec. Ces graines sont habituellement rejetées alors que l'utilisation correcte de ces déchets peut entraîner une nouvelle source importante de farine (**Chougui et al., 2013**). Le polysaccharide (constitué par les monosaccharides : rhamnose, arabinose et glucose) extrait à partir d'*O. ficus indica* peut être considéré comme un candidat potentiel pour les antioxydants naturels et les aliments fonctionnels favorables à la santé (**Zhong et al., 2010**).

La tige de cette plante est utilisée dans les aliments pour animaux et les humains et aussi pour une utilisation thérapeutique (**Ncibi et al., 2008**). Elle est reconnue pour son contenu en flavonoïdes tels que la quercétine, la taxifoline, le kaempferol auxquels le rôle de protection du foie peut être attribué (**Ncibi et al., 2008**).

Il a été prouvé aussi que les flavonoïdes quercétine, (1) -dihydroquercétine et 3-méthyléther isolés à partir des fruits et des tiges d'*O.ficus-indica* var. *Saboten* sont dotés d'un pouvoir protecteur contre les lésions neuronales oxydatives induites dans les cellules corticales du rat en culture primaire (**Ncibi et al., 2008**).

Les poires sont consommées comme des fruits frais ou utilisées pour la confiture traditionnellement produite. L'importance nutritionnelle de ces fruits est principalement due à l'acide ascorbique, la vitamine E, les caroténoïdes, les fibres, les acides aminés et la grande teneur en glucose (35%) et en fructose (29%) (**Alimi et al., 2013**).

L'intérêt pharmaceutique des poires épineuses d'*Opuntia ficus indica* a été attribué à son activité anti-ulcérogène, activité antidiabétique et à la chimioprévention du cancer (**Alimi et al., 2013**).

L'administration de jus *O. ficus indica* protégerait de manière significative les lipides et les protéines contre les modifications oxydatives induites par l'éthanol dans les érythrocytes de rat. L'effet bénéfique du jus d'*O. ficus indica* peut résulter de l'inhibition des réactions en chaîne des radicaux libres induites par l'éthanol dans les érythrocytes de rat ou de l'amélioration des activités antioxydantes endogènes (Alimi et al., 2013). De même, des tests antioxydants réalisés in vitro ont prouvé que les polyphénols et les flavonoïdes d'*O. ficus –indica* possèdent des capteurs de radicaux libres et que son extrait a un effet protecteur potentiel contre les dommages immunitaires induits par le chlorpyrifos (CPF) (Smida et al., 2017).

Cette adaptation aux climats arides et semi-arides leur permet d'être une ressource agricole intéressante. Les fruits aux noix de cactus ont beaucoup de valeur commerciale. Ils sont très aromatisés et ont d'excellentes propriétés nutritionnelles. Les fruits sont utilisés pour la fabrication de produits alimentaires tels que le jus, les boissons alcoolisées, les confitures et les édulcorants liquides naturels.

La consommation régulière de jus de cactus permet de réduire le taux de cholestérol et de glucose dans le sang (Hfaiedh et al., 2008) et inhiber les effets de l'empoisonnement au nickel sur la lipidémie (Hfaiedh et al., 2008). L'effet hypocholestérolémique de la pectine de poire épineuse n'est pas la conséquence de la réduction de l'absorption du cholestérol, mais plutôt de l'augmentation de l'expression du récepteur de l'apolipoprotéine B / E et des changements dans l'homéostasie du cholestérol hépatique (Hfaiedh et al., 2008).

2.3. *Camellia sinensis* (Thé vert)

2.3.1. Historique du thé vert

2.3.1.1. La découverte de l'empereur Sheng Nung

De nombreuses légendes relatent la découverte du thé. La plus ancienne est celle de l'empereur Sheng Nung (2737-2697 av. J.-C), considéré en Chine comme le «père de la médecine» pour avoir testé des centaines de plantes médicinales. Après une partie de chasse éprouvante, il aurait mis de l'eau à bouillir afin de se désaltérer, comme le veut la coutume extrême-orientale. Quelques feuilles de thé ont été bouillies par hasard dans l'eau, et un parfum agréable a été produit. Intrigué, l'empereur aurait décidé de goûter le breuvage, l'aurait trouvé fort bon et aurait redoublé d'enthousiasme en constatant son effet revigorant (Sangmanee et al., 1999 ; , Saeed et al. 2017).

Les théiers sont des arbustes (figure n° 8) à feuilles persistantes, d'un vert profond et brillant sur leur face supérieure, plus clair et mat sur leur face inférieure, dentelées et de forme effilée. Leurs petites fleurs sont blanches à pistil doré. Les jeunes pousses et les bourgeons sont couverts d'un fin duvet blanc qu'on appelle «Pakho» en chinois, mot qui à l'origine du terme «Pekoe» (Sangmanee et al., 1999).

2.3.2. Classification

Règne : Plantae

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Theales

Famille : Theaceae

Genre : *Camellia*

Nom binomial : *C. sinensis*



Figure n° 8 : Photo de la plante *Camellia sinensis*

Le thé vert est l'une des boissons les plus populaires consommées dans le monde entier (Araghizadeh et al., 2013). Le thé est une infusion de feuilles savoureuses qui a été consommée pendant des siècles comme une boisson et est valorisée pour ses propriétés médicinales (Mbata et al., 2008).

La principale différence entre le thé vert et le thé noir est dans le processus de fermentation requis pour produire du thé. Dans le cas du thé noir, les feuilles et les bourgeons sont fermentés ou oxydés après avoir été séchés (Archana et Abraham, 2011). Le thé vert est un thé non fermenté (Mbata et al., 2008), et les feuilles s'allient après leur séchage (Archana et Abraham, 2011).

2.3.3. Les principaux constituants bioactifs de *Camellia sinensis*

La composition phytochimique du thé révèle la présence d'alcaloïdes, de saponines, de tanins, de vitamine C, provitamine A (bêta carotène) (Schwarz et Schweppe, 2008), de catéchines, de polyphénols et L-théanine (Mbata et al., 2008 ; , Saeed et al. 2017).

Egalement, la feuille de théier contient non seulement du manganèse et du fluor, mais aussi des traces de fer, de magnésium, de cuivre, de nickel, d'aluminium, de zinc, de phosphore et de quantité d'autres minéraux et oligoéléments (Schwarz et Schweppe, 2008).

Les molécules phytochimiques présents dans les feuilles de thé sont très sensibles au processus d'oxydation. Le thé vert contient entre 30 et 40 pour cent de polyphénols extractibles à l'eau, tandis que le thé noir contient entre 3 et 10 pour cent (Archana et Abraham, 2011). Les principaux composés polyphénoliques du thé, en particulier les flavonoïdes sont la gallocatéchine (GC), l'épigallocatechine (EGC), le gallate d'épigallocatechine (EGCG), l'épicatéchine (EC) et les proanthocyanidines (Sakanaka et al., 1989 ; , Mbata et al., 2008 ; , Archana et Abraham, 2011 ; , Takayuki et al., 2011 ; , Taylor et al., 2015 ; , Kellogg et al., 2017). Ces molécules sont des antioxydants importants dont l'EGCG est le composant le plus luxuriant dans l'extrait de thé reconnu pour ces plus puissantes activités biologiques. Elles peuvent représenter jusqu'à 30% du poids sec pour les feuilles de thé fraîches (Archana et Abraham, 2011 ; , Taylor et al., 2005).

Les feuilles fraîches contiennent de la caféine (environ 3,5% du poids sec total, ou environ 50 mg / tasse lors de la brasserie), de la théobromine (0,15-0,2%), de la théophylline (0,02-0,04%) et d'autres méthylxanthines, de la lignine (6,5%), les acides organiques (1,5%), la chlorophylle (0,5%) et les acides aminés libres (1-5,5%), en plus de l'acide aminé unique, la théanine (4%); de nombreux "composés de saveur" sont également présents avec des quantités beaucoup plus faibles (Taylor et al., 2005).

2.3.4. Domaine d'applications de la plante *Camellia sinensis*

C'est sous les Han (206 av. J. -C. à 220 ap. J. -C.) que les chinois découvrirent l'usage pharmacologique du thé, réputé pour soulager la fatigue, délecter l'âme, fortifier la volonté et la vue (Schwarz et Schweppe, 2008).

En Europe aussi ses vertus furent étudiées. Philippe Sylvestre Dufour, dès 1685, dans son *traité du thé*, rappelle que «l'excellente boisson guérit des maux de tête». Depuis, les chimistes ont confirmé la présence de théine et de théophylline, stimulants cardiaques, cérébraux et diurétiques, de flavonoïdes, qui freinent la cholestérolémie et ont une action hypotensive, de fluor, de catéchols, antiseptiques, et de vitamine C. La cosmétologie tire parti des propriétés du thé vert dans des produits de beauté les plus divers (Sangmanee et al., 1999).

Il a reçu beaucoup d'attention en ce qui concerne ses effets bénéfiques sur divers problèmes de santé humaine. Le thé préparé à partir de *Camellia sinensis* est de trois types: thé vert non fermenté qui est coagulé ou cuit à la vapeur et séché pour inactiver ses enzymes, le thé noir fermenté et le thé oolong semi-fumé. Le thé vert avec des ingrédients chimiques actifs possède des propriétés pharmacologiques diverses qui sont liées à une incidence plus faible de certains états pathologiques, y compris le cancer buccal, les caries dentaires, les accidents vasculaires cérébraux, les maladies cardiovasculaires et l'obésité (Araghizadeh et al., 2013).

De plus, de nombreux rapports sur les activités anti-inflammatoire, anti-cancérogènes, antimutagènes, antimicrobiennes, antifongiques, antioxydantes et hypocholestérolémie du thé vert et de ses constituants sont documentés (Mbata et al., 2008, Saeed et al. 2017). Les effets favorables à la santé du thé vert sont principalement attribués à ses teneurs en polyphénols communément appelées catéchines. Ces composants ont inhibé la croissance de nombreuses bactéries pathogènes telles que *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline, *Streptococcus sobrinus*, *Salmonelle typhi*, *Shigella dysenterie*, *Shigella flexneri* et *Vibrio cholera*. Les polyphénols du thé vert ont également été jugés efficaces contre le virus de l'immunodéficience humaine, l'hépatite et les virus de la grippe. Une consommation quotidienne modérée de thé vert a tué *Staphylococcus aureus* et d'autres bactéries nocives (Mbata et al., 2008).

Des recherches scientifiques ont rapporté que l'extrait de thé est efficace contre diverses souches bactériennes isolées de patients atteints de tuberculose infectée. L'activité antibactérienne du thé

ture contre *Campylobacter sp.* et l'activité protectrice du thé contre l'infection par *Vibrio cholera* ont également été rapportées (Mbata et al., 2008).

L'extrait méthanolique et aqueux présentait des activités antibactériennes contre *L. monocytogenes* (Mbata et al., 2008).

Les feuilles de thé sont connues pour leur activité antimicrobienne contre de nombreux microorganismes. Une consommation modérée de thé vert tue *S. aureus*, *Vibrio parahemolyticus*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Plesiomonas shigelloides*, etc.

En outre, l'activité antimicrobienne synergique du thé et des antibiotiques contre les entérostomies est efficace. L'utilisation combinée de thé et d'antibiotiques pourrait être utile dans la lutte contre le problème de la résistance aux médicaments, en particulier chez les entéro-pathogènes. Par exemple, l'effet antimicrobien du chloramphénicol était de 99,99% de mieux lorsqu'il était pris avec du thé vert que seul. Des travaux scientifiques ont rapporté que l'EGCG du thé est un potentiellement immunomodulateur et un agent antimicrobien. De nombreuses études épidémiologiques et pharmacologiques démontrent que l'extrait de thé vert possède d'importants effets antioxydants (Archana et Abraham, 2011).

Un extrait de thé vert japonais, a montré une capacité inhibitrice de la croissance de *S. mutans* en inhibant son adhérence à la surface des dents (Saeed et al. 2017), une bactérie responsable de la carie dentaire. Cet extrait a montré également, des effets antimutagènes et antihépatotoxiques, une activité de résistance à la congestion du sang capillaire, une activité antitumorale, des effets hypolipidémiques et antioxydants (Sakanaka et al., 1989). Le thé vert est généralement dégusté après chaque repas comme le veut une coutume au Japon, Un dicton traditionnel selon lequel la consommation de thé vert rend la bouche propre, a été l'initiateur de nombreux travaux de recherche sur l'éventuel effet bactéricide des polyphénols du thé (Sakanaka et al., 1989). En effet, les polyphénols d'extraits de thé vert tels que l'EGCG et l'ECG ont révélé des effets antibactériens et inhibé les *staphylocoques sp.*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia* et *Salmonella*. Une concentration de 50µg / ml-100µg / ml d'EGCG et d'ECG, détruit les bactéries gram-positives; et une concentration de 800 µg / ml inhibe les bactéries pathogènes Gram négatives. Les spores de *C. botulinum* et de *C. butyricum* ont été également inhibées par les catéchines (Saeed et al. 2017).

L'activité antioxydante des catéchines du thé vert s'est révélée plus puissante et plusieurs fois supérieure à celle de la vitamine C et de la vitamine E (Takayuki et al., 2011). Il a été rapporté qu'un dentifrice contenant de la vitamine C s'est montré efficace pour inhiber le stress oxydatif gingival dans les lésions parodontales (Takayuki et al., 2011). Ainsi, les catéchines du thé vert topiques peuvent donc également être un agent thérapeutique plus efficace, agissant pour supprimer l'inflammation parodontale avec une diminution plus importante du stress oxydatif gingival (Takayuki et al., 2011). Aussi, L'OTEE (extrait éthanolique de thé oolong) et l'EGCG peuvent être utilisés comme médicaments anti-inflammatoires, ce qui se traduit par leur capacité à réduire la production de NO, COX-2, IL-6, IL-1b et TNF-a dans les macrophages actifs (Novilla et al., 2017). Une étude épidémiologique (Takayuki et al., 2011) a révélé une association inverse entre la consommation de thé vert et les paramètres cliniques parodontaux (profondeur de palpation, niveau d'attachement clinique et saignement au palpation). Selon une étude clinique, la libération lente des catéchines du thé vert améliorerait les effets du traitement parodontal traditionnel pour soigner la parodontite (Takayuki et al., 2011). En outre, une étude sur les animaux a démontré que l'injection de catéchines de thé vert dans la gencive enflammée induite par LPS a supprimé la perte osseuse alvéolaire en inhibant la production de cytokines pro-inflammatoires. Cependant, il n'est toujours pas clair comment l'application topique d'un dentifrice contenant des catéchines de thé vert aux lésions parodontales affecte le stress oxydatif gingival et l'inflammation parodontale (Takayuki et al., 2011).

La consommation de thé vert est liée à une incidence plus faible de divers états pathologiques, y compris des maladies cardiovasculaires, des accidents vasculaires cérébraux, de l'obésité et du cancer (Takayuki et al., 2011). Des études cliniques récentes ont révélé des réponses physiologiques aux extraits de thé qui peuvent être pertinentes pour la promotion de la santé, ainsi que la prévention ou le traitement de ces maladies chroniques (Takayuki et al., 2011). Ces effets ont été attribués, en partie, aux activités antioxydantes des composants polyphénoliques. Des travaux de recherches (Takayuki et al., 2011) ont, cependant, rapporté la capacité de ces molécules à moduler la structure physique des membranes cellulaires. Ainsi, un certain nombre de processus cellulaires dépendants de la membrane, tels que la signalisation cellulaire, et le cycle cellulaire, le métabolisme de l'acide arachidonique, et la prolifération cellulaire, l'apoptose et la fonctionnalité mitochondriale peuvent être influencées par l'interaction des catéchines avec la palissade des phospholipides cellulaires (Takayuki et al., 2011). Dans ce contexte, l'EGCG

induit la mort de cellules apoptotiques et l'arrêt du cycle cellulaire dans des cellules tumorales mais pas dans leurs homologues normaux; Il affecte également favorablement plusieurs voies de transduction du signal et est efficace dans les modèles animaux d'induction tumorale (**Takayuki et al., 2011**).

De plus, les graines de *C. sinensis* ont été développées ces dernières années comme ressources d'huile comestible; elles contiennent environ 30% d'huile, avec 46,3-56,3% d'acide oléique et 22,7-29,4% d'acide linoléique (**Wang et al., 2017**).

2.4. *Phlomis crinita*

Nom commun : «Djaada» (**Kabouche, 2005**)

2.4.1. Classification

Royaume : Plantes

Sous royaume : Tracheobiontes

Embranchement : Spermatophytes

Division : Magnoliophytes

Classe : Magnoliopsides

Sous classe : Asteridae

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiaceae

Genre: *Phlomis*

Espèce : *Phlomis crinita*



Figure n° 9 : Photo de la plante *Phlomis crinita*

Le genre *Phlomis* (Lamiaceae) comprend de 100 à 250 espèces mondiales (**Lazreg et al., 2011 ; Mathiesen et al., 2011**) avec un centre principal de diversification dans le bassin de la Méditerranée orientale (**Albaladejo et al., 2005**) dont 34 croissent en Turquie , 17 se trouvent en Iran et 4 poussent en Algérie. 3 espèces algériennes sont endémiques à l'Afrique du nord (*P. boveii*, *P. caballeroi* et *P. crinita*), la quatrième (*P. herba-venti*) étant méditerranéenne (**Kabouche, 2005**).

Le mot *crinita* signifie "bien fourni" en italien. La plante (figure n° 9) est un arbuste (**Ben Amor et al., 2008**) mesure plus de 75 cm de hauteur, caractérisée par de larges et grosses feuilles ovales lancéolées ou ovales faisant 6 à 18 mm de longueur (**Lazreg et al., 2011**). Le pétiole fait 7 cm, les feuilles florales sont rhombiques de 2-4 x 1-2.5 cm, elles sont sessiles. Bractées inférieures à 1 mm de largeur, linéaires 10-18 mm avec des poils souples dépassant 3 mm de long, émanant d'une base stellaire. Le calice est couvert de poils stellaires, la corolle est marron à jaune (**Kabouche, 2005 ; Ben Amor et al., 2008**). De loin, les feuilles et les tiges ont une couleur grise (**Kabouche, 2005**).

Phlomis crinita comprend deux sous-espèces différentes suivant un modèle de variation éco-morpho-géographique. *Phlomis crinita* sub sp. *La malacitana* est limitée aux montagnes supérieures à 1000 m en Andalousie. D'autre part, *P. Crinita* sub sp. *Crinita* se développe chez Levante, dans des habitats beaucoup plus secs habituellement inférieurs à 800 m (**Albaladejo et al., 2005**).

2.4.2. Les principaux constituants bioactifs de *Phlomis crinita*

Outre les flavonoïdes qui sont : Luteolin, luteolin 7-β-D-glycopyranoside et chrysoerio 17-β-D- (3 "-E-comaoyl) –glucopyranoside (**Lazreg et al., 2011**), les phényléthanoides, des métabolites secondaires du *Phlomis*. Une étude sur la composition chimique de cette plante a révélé la présence de glycosides du phényléthanol estérifié par l'acide cinamique (ex. acide caféique, férulique, p-coumarique). Ils ont un effet inhibiteur sur les enzymes 5-lipase oxygénase, adénosine monophosphate réductase cyclique, aldose réductase et sur la protéine kinase, en plus de leurs effets immunosuppresseurs, cytotoxique et cytostatique, anti-inflammatoire, antinociceptif et antimicrobien (**Kabouche, 2005 ; Lazreg et al., 2011**).

Les iridoïdes glycosides, autres métabolites secondaires du genre *Phlomis*, sont des glycosides comprenant un cyclopentane et des cycles pyraniques. Les iridoïdes glycosides possèdent des

activités biologiques diverses; ils peuvent être cholérétiques, purgatifs, hépato-protecteurs, vasoconstricteurs, anti-microbiens, analgésiques, anti-tumoraux, sédatifs et anti-inflammatoires (**Kabouche, 2005**).

L'huile essentielle de la partie aérienne de *Phlomis crinita* contient 64 composés identifiés les plus importants sont α -Pinène (21,1 %), β -Caryophyllène (20,68 %), Germacrene-D (17,40 %) éthyl Thymol (8,67 %). D'autres composés tels que acétate de Terpényle (6,42 %), Z β -Ocimène (4,32 %), E β Ocimène (2,58 %), trans-Murrolol (3,07 %), méthyl Carvacrol (1,60 %), trans-Cadinol (1,57 %), Carvacrol (1,29 %), 1-8 Cinéol (1,23 %) et Manool (1,00 %) (**Lazreg et al., 2011**).

2.4.3. Domaine d'applications de la plante *Phlomis crinita*

Depuis des millénaires, les plantes du Genre *Phlomis* sont utilisées en médecine traditionnelle comme stimulant et tonique et pour la guérison des plaies (**Kabouche, 2005 ; , Ben Amor et al., 2008**), remède contre les désordres gastriques (douleurs d'estomac et ulcères peptiques) et traitement des hémorroïdes (**Lazreg et al., 2011**). En Chine, le *Phlomis* sert à calmer les douleurs alors qu'au Tibet, les racines sont utilisées pour traiter les rhumes et les états fébriles. Les propriétés curatives de *Phlomis* sont aussi appréciées en Inde (Cachemire) où on s'en sert également comme plante médicinale et comme insecticide (**Kabouche, 2005**).

De nombreuses études ont montré diverses activités, telles que les activités anti-inflammatoires, immunosuppressives, piégeage des radicaux libres, antimicrobiennes, anti-ulcérogènes et antimutagènes. Leurs huiles essentielles sont utilisées dans les industries alimentaires et pharmaceutiques, dans l'industrie des parfums et cosmétiques. Ils ont été proposés comme agents conservateurs naturels pour les préparations cosmétiques en raison de leurs activités antimicrobiennes (**Ben Amor et al., 2008**).

En Algérie, elle est utilisée pour traiter les brûlures, les lésions et les infections de la peau ainsi que certaines allergies. Elle est aussi utilisée pour ses vertus gastroprotectives (**Tamert et Latreche, 2015**).

Chapitre 3

LES MOLÉCULES BIOACTIVES

3.1. Les polyphénols

Plusieurs milliers de molécules ayant une structure de polyphénol (c-à-d d plusieurs groupes hydroxyles sur des cycles aromatiques) ont été identifiées chez les plantes supérieures, et plusieurs centaines ont été trouvées dans les plantes comestibles (**Manach et al., 2004**). Ces molécules qualifiées de métabolites secondaires complexes (**Manchado et al., 2006 ; , Collin et al., 2011 ; , Li and al., 2014 ; , Hui Suan Ng et al., 2017**) sont généralement impliquées aussi bien dans la protection contre les rayonnements ultraviolets que des agressions par des agents pathogènes (**Manach et al., 2004**), leur répartition qualitative et quantitative est inégale selon les espèces, les organes, les tissus et les stades physiologiques des plantes. Ces biomolécules correspondent à une très large gamme de structures chimiques témoignant ainsi de l'extraordinaire capacité de biosynthèse des plantes et suscitant un intérêt croissant pour leurs nombreuses propriétés biologiques utilisées dans des domaines variés tel que l'agroalimentaire ou la pharmacologie (**Manchado et al., 2006**).

3.1.1. Principales structures phénoliques

Les composés phénoliques peuvent être divisés en différents groupes selon leur diversité structurale, la complexité du squelette de base (allant d'un simple C6 à des formes très polymérisées, le nombre d'anneaux de phénol...), le degré de modification de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation, de méthylation...) et, enfin les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines, autres métabolites secondaires) pouvant être ou non des composés phénoliques (**Manchado et al., 2006, Li and al., 2014 et Selka et al., 2016**).

3.1.1.1. Acides phénoliques

Il existe deux classes des acides phénoliques: les acides hydroxy-benzoïques et les acides hydroxycinamiques (figure 10) (**Manach et al., 2004 ; , Manchado et al., 2006 ; , Collin et al., 2011**).

3.1.1.1.1. Acides hydroxybenzoïques

Ils sont dérivés de l'acide benzoïque (figure n° 10) et ont une structure du type C6-C1 (**Manchado et al., 2006 ; , Collin et al., 2011**). Ils existent fréquemment sous forme d'esters ou de glucosides et peuvent également être intégrés dans des structures complexes comme certains tanins (**Manchado et al., 2006**). La teneur en acide hydroxy-benzoïque des plantes comestibles est généralement très faible, à l'exception de certains fruits rouges, radis noir, et les oignons, qui peuvent avoir des concentrations de plusieurs dizaines de milligrammes par

kilogramme de poids frais. Le thé est une source importante d'acide gallique: les feuilles de thé peuvent contenir jusqu'à 4,5 g / kg de poids frais. En outre, les acides hydroxybenzoïques sont les composants de structures complexes telles que les tanins hydrolysables : gallotannins dans les mangues et les ellagitanins dans les fruits rouges comme les fraises, les framboises et les mûres. Ces acides hydroxybenzoïques ; libres et estérifiés, ont été très peu étudiés vu qu'on les retrouve seulement dans peu de plantes consommées par l'homme (**Manach et al. 2004**).

Acides hydroxybenzoïques

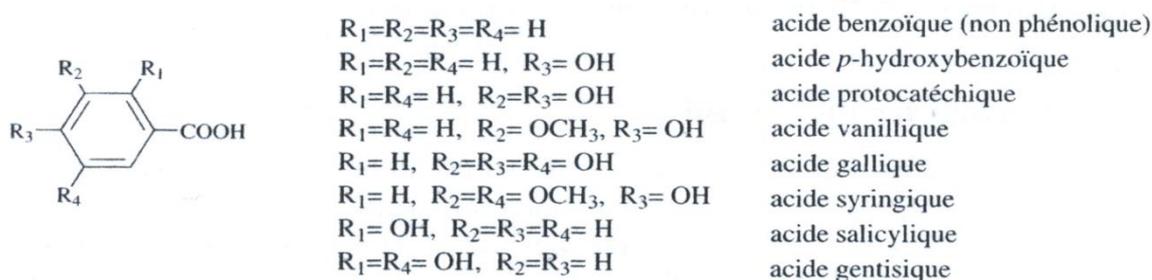


Figure n° 10 : Structure chimique de l'acide hydroxybenzoïques

3.1.1.1.2. Acides hydroxycinnamiques

Ils représentent une classe très importante dont la structure de base (C6-C3) dérivée de celle de l'acide cinnamique (figure n° 11). Les molécules de base de la série hydroxycinnamique sont l'acide *p*-coumarique, caféique, férulique et sinapique (**Manchado et al., 2006, Collin et al., 2011**). Les acides hydroxycinnamiques sont rarement retrouvés dans la forme libre, sauf dans les aliments transformés qui ont subi la congélation, la stérilisation ou la fermentation. Les formes liées sont des dérivés glycosylés ou des esters de l'acide quinique, de l'acide shikimique, et de l'acide tartrique (**Manach et al., 2004**). L'acide caféique et l'acide quinique se combinent pour former de l'acide chlorogénique, que l'on trouve dans de nombreux types de fruits et avec des concentrations élevées dans le café. Les types de fruits ayant la plus forte teneur (bleuets, kiwis, prunes, cerises et pommes) contiennent 0,5-2 g d'acides hydroxycinnamiques / kg de poids frais (**Manach et al., 2004**).

Acides hydroxycinnamiques (« phénylpropanoïdes »)

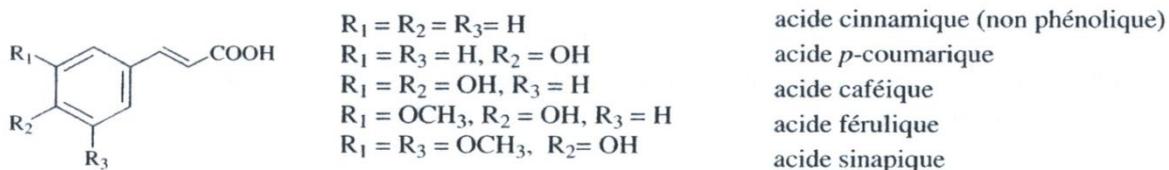


Figure n° 11 : Structure chimique de l'acide hydroxycinnamique

3.1.1.1.3. Coumarines

Présentes dans de nombreux végétaux, les coumarines (figure n° 12) ont une structure de base (C6-C3) dérivant des acides ortho-hydroxycinnamique. Elles sont produites en grande quantité en réponse à une attaque biotique ou abiotique et semblent constituer un moyen de défense de type phytoalexique (Collin et al., 2011).

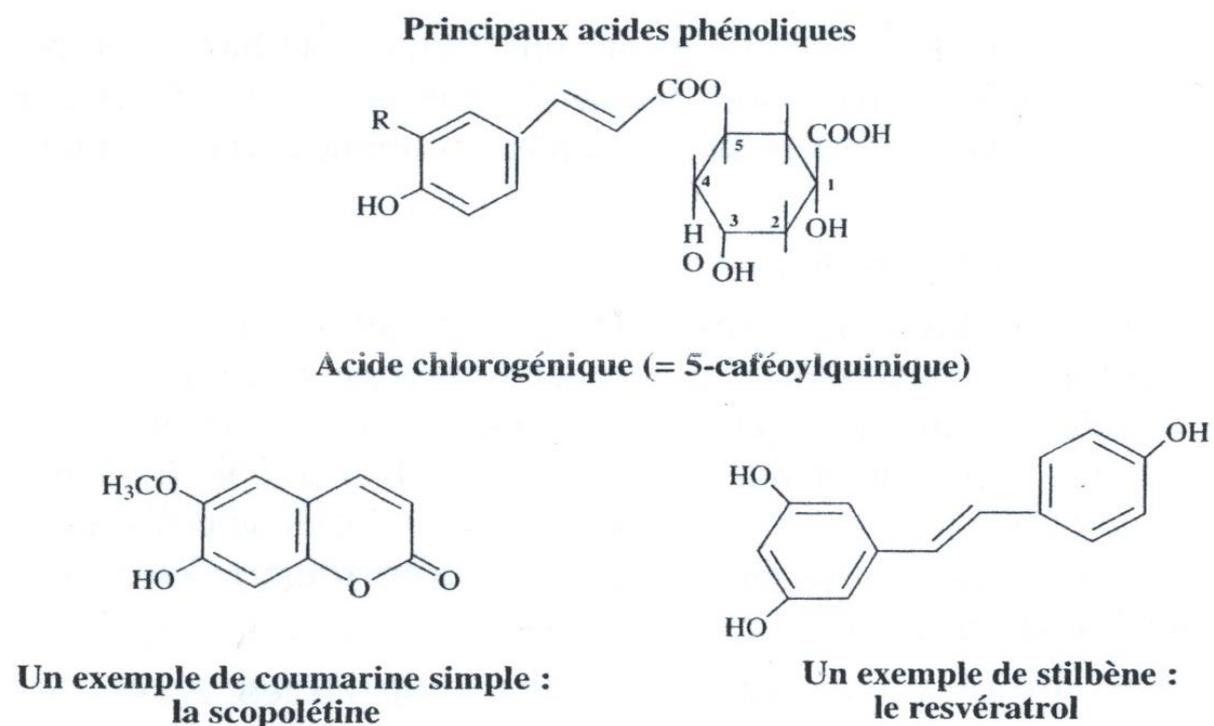


Figure n° 12 : Structure des principaux molécules phénoliques

3.1.1.2. Les flavonoïdes

Leur structure de base repose sur un squelette à 15 atomes de carbone (C6-C3-C6), constitué de deux noyaux aromatiques désignés par les lettres A et B, reliés par un hétérocycle oxygéné,

désigné par la lettre C (figure n° 13) (Barbosa, 2007). Cette famille de composés bioactifs comprend plusieurs milliers de molécules regroupées en plus de dix classes dont certaines ont une très grande importance biologique et technologique comme les anthocyanes, pigments rouges ou bleus des fleurs et des fruits, les flavonols (par exemple le Kaempférol et la quercétine dont la répartition est très large) et les flavanes qui sont à l'origine des tanins condensés (Manchado et al., 2006).

Au sein des flavonoïdes, on retrouve les flavonols, les flavones, les flavonoïdes et les tanins condensés, les (prényl) chalcones et les dihydrochalcones ainsi que les anthocyanines et anthocyanidines (Collin et al., 2011).

3.1.1.2.1. Flavonols

Les flavonols se caractérisent par un hétérocycle oxygéné relativement oxydé (figure n° 13). Ils existent principalement sous des formes glycosylées (glucose, xylose, arabinose, galactose, rhamnose) (Manach et al., 2004 et Collin et al., 2011).

3.1.1.2.2. Flavones et flavonoïdes

Les flavones et les flavonoïdes possèdent également la structure de base C6-C3-C6 (Collin et al., 2011). C'est d'abord la structure de l'hétérocycle central et son degré d'oxydation qui permettent de distinguer les différentes classes de flavonoïdes (figure n° 13). Le cas extrême d'oxydation de l'hétérocycle correspond aux anthocyanidines, toujours présentes en milieu acide sous forme d'un cation de couleur rouge, dit cation flavylum. Au contraire, dans le cas des flavanes, le cycle central est très fortement réduit. Exceptionnellement, le noyau central de la molécule peut ne pas être totalement cyclisé (chalcones) ou se présenter sous forme d'un cycle ne présentant que 5 sommets (aurones) (Manchado et al., 2006).

A l'intérieur de chacune des classes, les variations autour du squelette chimique de base en C15 portent principalement sur trois points:

- Le degré d'hydroxylation des différents cycles;
- Le niveau de méthylation (groupements O-CH₃ à la place des seuls fonctions phénoliques);
- Le niveau de glycosylation.

A côté des composés évoqués ci-dessus, de très nombreux autres phénols peuvent être présents chez les végétaux. Ainsi, la tyrosine est un acide aminé de nature phénolique constitutif des protéines chez tous les êtres vivants. Parmi les phénols simples on peut citer le

catéchol et le pyrogallol, un aldéhyde comme la vanilline, constituant majeur de l'arôme de la vanille, l'oleuropéine responsable de l'amertume de l'olive (Manchado et al., 2006).

Certains terpènes (thymol, gossypol...), des alcaloïdes (morphines, papavérine...) ou encore des composés azotés comme la bétanidine (pigment rouge de la betterave) sont également de nature phénolique, bien que rattachés à d'autres groupes de métabolites secondaires par leur origine biosynthétique et leurs propriétés. Les tocophérols (vitamine E) et les tocotriénols sont également caractérisés par un noyau portant un hydroxyle phénolique.

Les quinones peuvent également être rattachées aux composés phénoliques simples dont elles dérivent par des processus oxydatifs (Manchado et al., 2006).

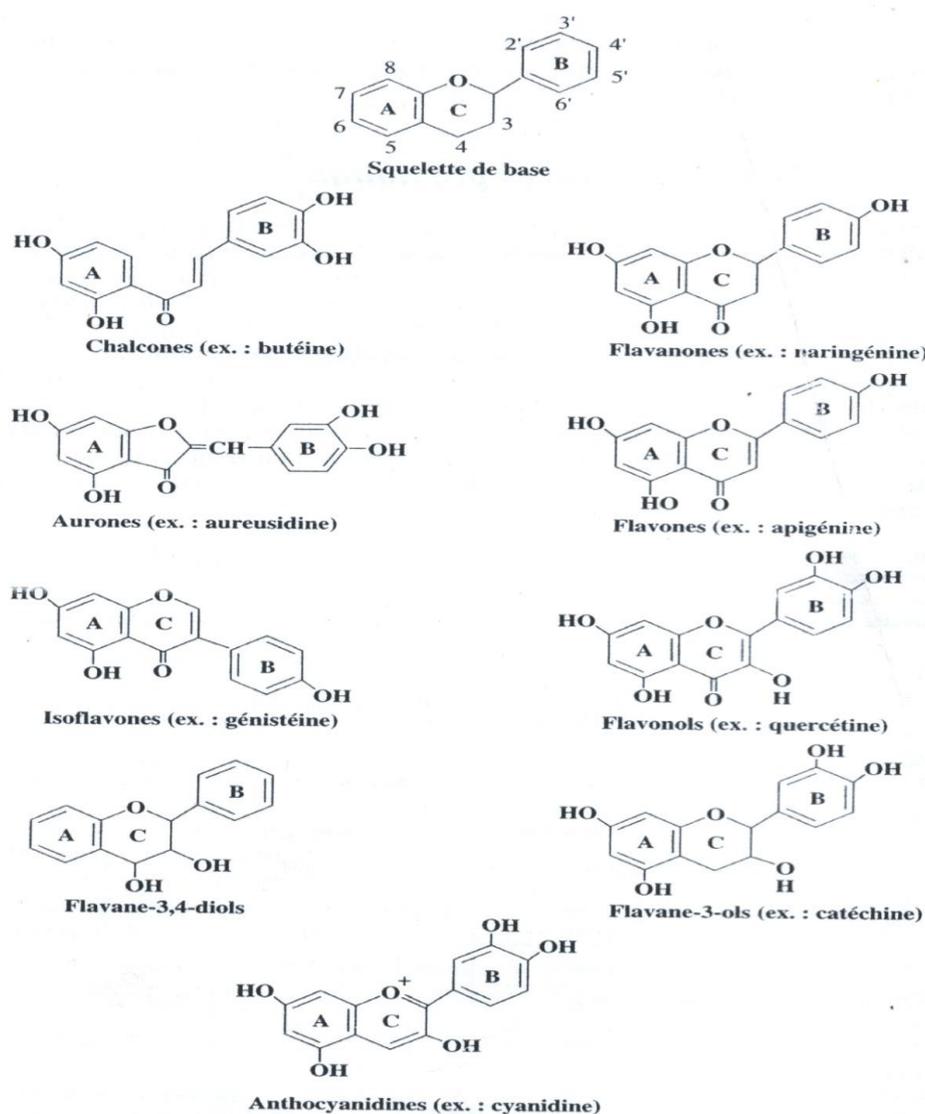


Figure n° 13 : Les principales classes de flavonoïdes (Manchado et al., 2006)

3.1.1.3. Tanins

Ce sont des formes phénoliques condensés capables de se lier aux protéines en solution et de les précipiter.

Il existe deux grands groupes de tanins qui se distinguent par leur réactivité chimique et leur composition: les tanins hydrolysables et les tanins condensés (**Manchado et al., 2006**).

3.1.1.3.1. Tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables (T_H) sont des esters d'acides phénoliques (acide gallique et ellagique) associé à un polyol (habituellement le glucose). Ils sont divisés en ellagitanins et gallotanins.

Les gallotanins libèrent par hydrolyse acide, hydrolyse basique, à l'eau chaude ou par action enzymatique de l'acide gallique (**Collin et al., 2011**).

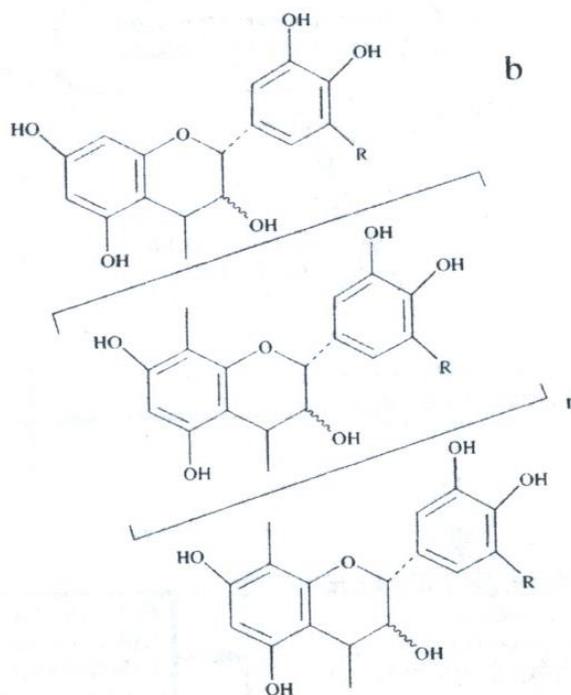
3.1.1.3.2. Tanins condensés

Les tanins condensés sont des oligomères ou des polymères de flavanes 3-ols dérivés de la (+)-catéchine ou de ses nombreux isomères et constituent la classe des tanins catéchiques (figure n° 14). Contrairement aux tanins hydrolysables, ils sont résistants à l'hydrolyse et seules des attaques chimiques fortes permettent de les dégrader. Ainsi, par traitement acide à chaud, ils se transforment en pigment rougeâtre et, pour cette raison, ils sont dénommés «proanthocyanidines» (**Manchado et al., 2006**).

3.1.1.4. Lignines

Les lignines constituent 15 à 35% du bois des Angiospermes et Gymnospermes, ce qui représente une biomasse considérable produite annuellement par les végétaux. En raison de leur caractère hydrophobe marqué, les lignines s'accumulent au niveau des parois des cellules du bois. Elles sont présentes au niveau des vaisseaux conduisant la sève brute et sont responsables de la rigidité des fibres végétales. On les trouve également dans des tissus végétaux présentant une forte résistance mécanique, comme le sclérenchyme des chaumes ou le noyau des fruits (**Manchado et al., 2006**).

Elles résultent de la polymérisation tridimensionnelle de trois unités phénoliques de base dénommés monolignols et qui sont les alcools coumarylique, coniférylique, dérivant respectivement des acides *p*-coumarique, férulique et sinapylique (**Manchado et al., 2006**).



R=H : unité procyanidine, dérivée de la catéchine
 R=OH : unité prodelphinidine, dérivée de la gallocatéchine

Figure 14 : Exemple de structure d'un tanin condensé (Manchado *et al.*, 2006)

3.1.1.5. Stilbènes

La structure chimique de base des stilbènes est composée de deux cycles aromatiques joints par un pont méthylène (figure n°12). Les deux formes isomères des stilbènes ont des propriétés chimiques et biologiques différentes (Collin *et al.*, 2011).

3.1.2. Biosynthèse des composés phénoliques

Les deux acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) sont présents dans les protéines mais sont également à l'origine de la formation de la plupart des molécules phénoliques chez les végétaux. Ils sont formés, à partir de sucres simples, issus du métabolisme primaire, par la voie de l'acide shikimique, conduisant à la formation de phénylalanine, qui, par désamination, donne le précurseur immédiat des phénols et de, l'acide cinnamique. La séquence biosynthétique qui suit, dénommée séquence des phénylpropanoïdes, permet la formation des principaux acides hydroxycinnamiques: acides coumariques, caféique, férulique et sinapique généralement présents dans le matériel végétal sous forme d'esters ou de glucosides (figure n°15).

Les formes métaboliquement actives des acides hydroxycinnamiques sont leurs esters avec le coenzyme A qui permettent alors d'accéder aux principales classes de composés phénoliques (Manchado *et al.*, 2006).

Des facteurs externes, comme l'exposition à la lumière et la température, influent d'une manière importante le métabolisme des polyphénols (**Manach et al., 2004 ; Manchado et al., 2006**). En effet, pour la lumière deux paramètres interviennent, l'intensité du flux lumineux et la nature des radiations constitutives. Dans le cas du raisin et de la pomme par exemple, la réduction de l'éclairage est généralement corrélée avec une diminution de la teneur en anthocyane. La lumière agit par des radiations bleues et rouges et du pigment végétal phytochrome, sur l'induction des enzymes métaboliques et tout particulièrement de la phénylalanine ammonialyase (PAL).

Egalement, un abaissement de la température associé à un traitement lumineux adéquat induit fréquemment une accumulation des anthocyanes chez de nombreux fruits. Des inhibiteurs de l'enzyme PAL pouvant être mis en place sous l'effet des températures élevées. Des perturbations du métabolisme phénolique peuvent quelquefois apparaître à la suite de traitements d'organes végétaux au froid, conduisant à des brunissements (accumulation de l'acide chlorogénique) (**Manchado et al., 2006**).

La contamination du végétal par des microorganismes pathogènes entraîne une forte augmentation des teneurs en composés phénoliques, correspondant à la mise en place de mécanismes de défense de la plante (le resvératrol de la vigne agit comme un antibiotique et les acides phénoliques contribuent à la guérison par lignification des zones endommagées) (**Manach et al., 2004 ; Manchado et al., 2006**).

Aussi, de nombreux facteurs, tels que la maturité au moment de la récolte, les facteurs génétiques, les facteurs environnementaux, la transformation et l'entreposage, peuvent affecter la teneur en polyphénols (**Manach et al., 2004 ; Li and al., 2014**). En général, les concentrations d'acide phénolique diminuent pendant la maturation, alors que les concentrations d'anthocyanines ont augmenté (**Li and al., 2014**).

Les facteurs environnementaux peuvent être pédoclimatiques (type de sol, exposition au soleil, chutes de pluie) ou agronomiques (culture dans les vergers ou les champs, culture biologique et culture hydroponique, les traitements hormonaux et application de fertilisants) (**Manach et al., 2004, Manchado et al., 2006**).

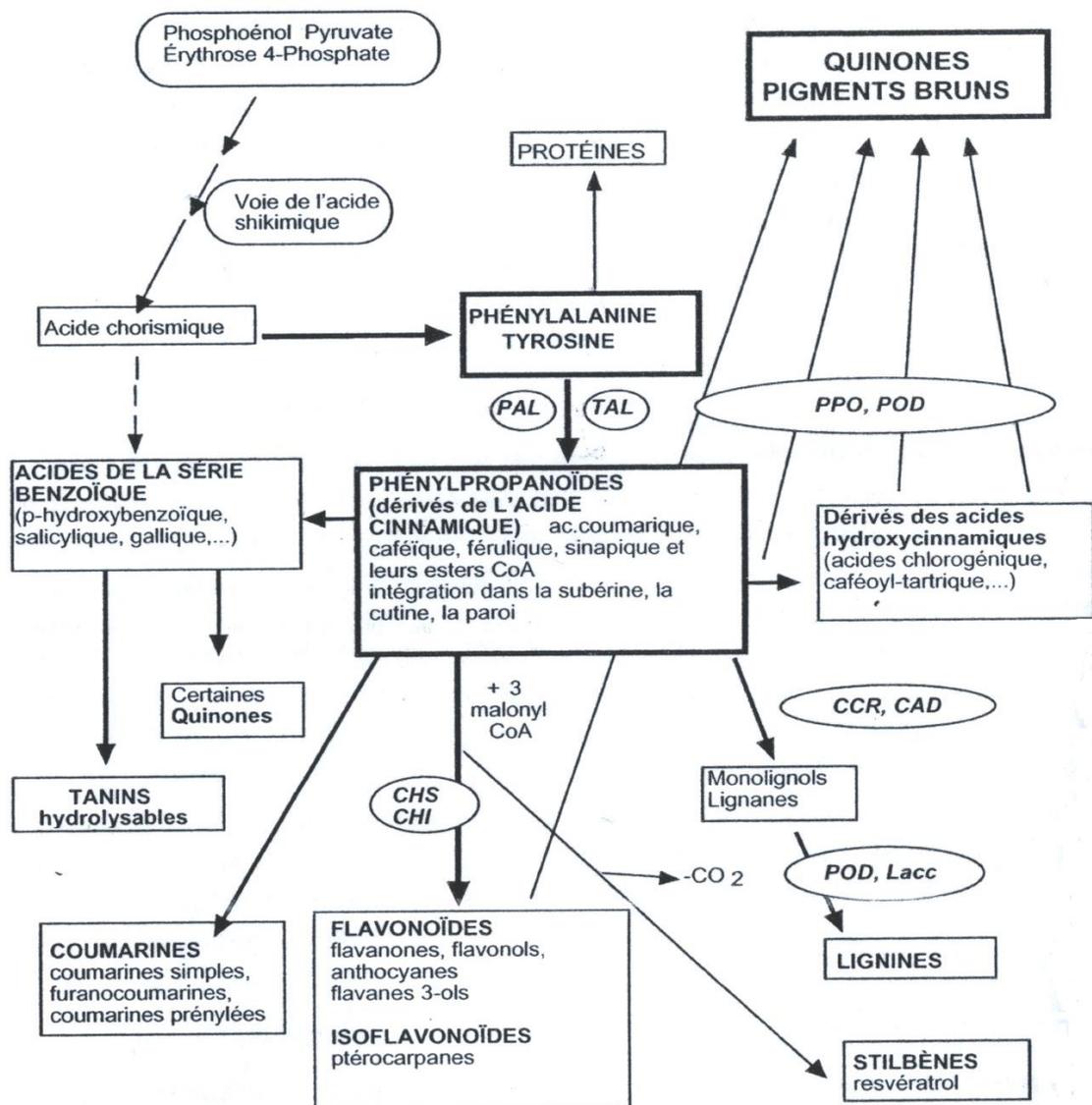


Figure n° 15: Les grandes lignes de la biosynthèse de principaux groupes de composés phénoliques (Manchado et al., 2006)

3.1.3. Les composés phénoliques dans les aliments

Des polyphénols naturels ont été trouvés dans de nombreuses plantes et aliments, comme les fruits, les légumes, le thé, les céréales, les plantes médicinales, les microalgues et les fleurs comestibles et sauvages (Li and al., 2014).

En effet, les fruits et les boissons comme le thé et le vin rouge constituent les principales sources de polyphénols. Certains polyphénols tels que la quercétine se retrouvent dans tous les produits végétaux (fruits, légumes, céréales, plantes légumineuses, jus de fruits, thé, vin, infusions, etc.), tandis que d'autres sont spécifiques à certains aliments (flavanones dans les agrumes, isoflavones dans le soja, phloridzine dans les pommes) (Tableau n°2).

Tableau n° 2: Teneur en composés phénoliques de quelques végétaux consommés par l'homme et leur répartition dans chaque plante (Manach *et al.*, 2004 ; , Manchado *et al.*, 2006 ; , Morand, 2013)

Les végétaux	Principaux composés phénoliques	La répartition des polyphénols dans l'organe du végétal
Les pommes	-100 mg à 3 g/Kg de phénols totaux. -Des monomères de flavanol (principalement l'épicatéchine) (> 120 mg/100 g) - ou des oligomères (principalement la procyanidine B2), l'acide chlorogénique (26 à 510 mg/Kg),et de petites quantités d'autres acides hydroxycinnamiques, 2 glycosides de la phlorétine, plusieurs glycosides de quercétine et des anthocyanes comme le cyanidine 3-galactoside dans la peau De certaines variétés rouges. Les profils de polyphénols de toutes les variétés de pommes sont pratiquement identiques, mais les concentrations peuvent varier de 0,1 à 5 g de polyphénols totaux / kg de poids frais et peut atteindre 10 g / kg dans certaines variétés de pommes à cidre.	-L'acide chlorogénique se concentre dans le cœur du fruit
Les pommes de terre	-32 à 103 mg/ Kg d'acides phénoliques -Elles aussi contiennent jusqu'à190 mg d'acide chlorogénique / kg, principalement dans la peau	-L'acide chlorogénique est plus abondant dans les parties externes du tubercule.
Agrumes	-La seule source de flavanones	-
Soja	-Isoflavones	-
Le café	-Acides hydroxycinnamiques: 92% d'acide caféique,	-
Fruits et jus de fruits combinés	-source de 59% d'acide p-coumarique	-
Feuilles de thé vert	-39% MS de phénols totaux	-
Fraises	-Anthocyanes	-Tissus profonds
Cassis	-1-10 g/Kg des anthocyanes	-Tissus profonds
Raisin rouge	-200 mg à 5 g/Kg des anthocyanes	-Les anthocyanes sont accumulés dans la pellicule des baies -21% des procyanidines oligomères sont dans les pellicules, 57% dans les pépins et 1% dans la pulpe
Ananas	- Esters <i>p</i> -coumaroylquiniques	-Un gradient croissant des esters <i>p</i> -

		coumaroylquiniques. D'une part, de l'intérieur vers l'extérieur et d'autre part du sommet vers la base du fruit
Pamplemousse	-Flavanone naringénine	-Se concentre dans l'albédo, le flavédo et la partie centrale fibreuse du fruit, alors que le pulpe n'en contient pas
Des graines de blé ou de seigle	-Acide férulique	-80% de l'acide est dans les téguments externes, alors que l'albumen est beaucoup moins riche
Piment	-Capsaïcine	-Fortes concentrations des composés phénoliques sont présentes dans les très jeunes fruits
Cacao et chocolat	-Monomères de catéchines (Flavan-3-ols (>920–1220mg/100g) -polymères de catéchines de masse moléculaire beaucoup plus élevée (aussi appelés procyanidines)	
Le thé	-Les flavan-3-ols (>300mg/ infusion)	

La répartition des composés phénoliques est très caractéristique. Dans la cellule, ils s'accumulent principalement dans deux sites: La paroi cellulaire où sont présents les lignines (acide férulique) et la vacuole où sont stockés les phénols solubles (acide chlorogénique). Ils pourraient aussi être présents dans le noyau et la membrane plasmique mais à des très faibles concentrations (quercétine). Cette répartition est modifiée par des perturbations membranaires qui interviennent, soit au cours de certaines évolutions physiologiques soit à la suite de divers traitements.

En outre, au niveau tissulaire, on observe également des répartitions très inégales des différents composés phénoliques. Ainsi, les anthocyanes et les pigments de types flavonols sont généralement présents dans les couches cellulaires externes des organes végétaux (épidermes des fruits), (voir tableau 2) (**Manchado et al., 2006**).

Le stockage peut également affecter la teneur en polyphénols qui sont facilement oxydés. Les réactions d'oxydation entraînent la formation de substances plus ou moins polymérisées, ce qui entraîne des changements dans la qualité des aliments, en particulier en ce qui concerne la couleur et les caractéristiques organoleptiques. De tels changements peuvent être bénéfiques

(comme c'est le cas pour le thé noir) ou nuisibles (brunissement des fruits) à l'acceptabilité des consommateurs.

Les méthodes de préparation culinaire ont également un effet marqué sur la teneur en polyphénols des aliments. Par exemple, le simple pelage des fruits et des légumes peut éliminer une part importante des polyphénols, car ces substances sont souvent présentes à des concentrations plus élevées dans les parties extérieures que dans les parties internes. Les méthodes de cuisson inappropriées peuvent entraîner une réduction significative du contenu des polyphénols. Les oignons et les tomates perdent entre 75% et 80% de leur teneur initiale en quercétine après 15 minutes d'ébullition, 65% après cuisson dans un four à micro-ondes et 30% après la friture (**Manach et al. 2004 ; , Li and al., 2014**).

3.1.4. Le rôle des composés phénoliques dans la plante

- La structure complexe de la lignine est en relation avec la rigidification des parois cellulaires des vaisseaux du bois. Cela permet la conduction de la sève brute à l'intérieur de la plante et la formation d'une structure rigide qui participe au port dressé des végétaux ligneux;
- Des interactions entre les composés phénoliques, l'organogénèse et la croissance de la plante. Ils participent dans la régulation du taux endogène d'auxine par action sur l'auxine-oxydase;
- La participation de la tyrosine et l'acide férulique à la régulation de la croissance pariétale par modification du niveau de réticulation des polymères protéiques ou polyosidiques des parois. Ces modifications peuvent être des réponses de la plante à l'agression par des agents pathogènes;
- Intervention de certains flavonoïdes dans la régulation de la stérilité mâle chez pétunia. Le grain de pollen contient des glycosides de flavonols très spécifiques du gamétophyte, mais qui sont absents chez certaines plantes mutantes ou transgéniques. Dans ce cas, le pollen est incapable de germer et le blocage peut être levé par apport de kaempférol;
- Ils participent à l'équilibre redox de la plante puisqu'ils sont facilement oxydés
- Ils jouent un rôle dans l'interaction de la plante avec son environnement. Les pigments de nature phénolique attirent les insectes et les oiseaux qui assurent la pollinisation des fleurs colorées ou la dissémination de fruits;

- Tous les composés phénoliques absorbent les rayonnements UV et participent à la protection des végétaux des rayonnements solaire, en particulier en raison de leur localisation superficielle dans les tissus;
- Beaucoup de phénols ou les quinones qui en dérivent par oxydation sont des inhibiteurs du développement de certains microorganismes saprophytes ou parasites, bactéries ou champignons;
- L'intervention de molécules phénoliques dans les phénomènes de reconnaissance initiale entre les microorganismes et la plante. Ainsi la régulation des gènes de nodulation chez les bactéries symbiotiques du genre *Rhizobium* fait intervenir des flavonoïdes issus des légumineuses (Manchado et al., 2006).

3.1.5. Les Activités biologiques des polyphénols

Les polyphénols naturels possèdent de nombreuses activités biologiques et des avantages pour la santé, dans la prévention et le traitement des maladies liées à l'âge, des cancers, des maladies cardiaques, des maladies inflammatoires, etc. (Dominguez-Rodriguez et al., 2017 ; Esteban-Fernandez et al., 2017).

3.1.5.1. Protection cardiovasculaire

Les flavonols et les flavonoïdes ont un effet cardioprotecteur par leurs effets antioxydants, inhibiteur de l'activité plaquettaire et leurs propriétés vasodilatatrices. Des études prospectives conduites sur trois cohortes (américaine et européennes) dégagent des associations positives entre le niveau de consommation de flavan3-ols monomères et de procyanidines, via le cacao et ses produits dérivés, et la protection cardiovasculaire (Collin et al., 2011 ; Morand, 2013).

Egalement, la consommation de thé vert serait associée à un risque plus faible de maladies coronariennes. Ce résultat, qui repose sur cinq études menées en Asie, doit encore être confirmé, car seulement deux études prospectives sont disponibles. En revanche, aucun effet protecteur du thé noir sur le risque de MCV n'a été retrouvé. L'association entre consommation de thé et accident vasculaire cérébral (AVC) a également été évaluée récemment dans une méta-analyse (Li and al., 2014).

De nombreuses études ont montré que les polyphénols alimentaires pouvaient réduire le risque de thrombose, qui est l'une des principales causes d'infarctus du myocarde, de cardiopathie ischémique, etc. (Li and al., 2014).

Les effets cardioprotecteurs du vin rouge ont été attribués à sa teneur élevée en polyphénols antioxydants, y compris le resveratrol et les proanthocyanidines. Le resvératrol est un polyphénol abondamment trouvé dans les raisins et le vin (**Li and al., 2014**).

3.1.5.2. Activité anti-cancérigène

Les effets anticancéreux des polyphénols ont été observés au niveau de la bouche, de l'estomac, du duodénum, du côlon, du foie, du poumon, de la glande mammaire ou de la peau. Beaucoup de polyphénols, comme les proanthocyanidines, les flavonoïdes, le resvératrol, les tanins, l'épigallocatechine-3-gallate, l'acide gallique et l'anthocyanine ont été testés ; Tous ont montré des effets protecteurs dans certains modèles bien que leurs mécanismes d'action aient été différents (**Li and al., 2014**).

Les proanthocyanidines inhibent de manière significative la croissance des cellules tumorales 4T1 implantées. De plus, la métastase des cellules tumorales dans les poumons a été inhibée de manière significative et la survie des souris a été améliorée.

Des études ont montré que les extraits de baies riches en anthocyanines inhibaient de manière significative les expressions du facteur de croissance endothélial vasculaire induites par H₂O₂ et TNF- α , un régulateur clé de l'angiogenèse tumorale, par les kératinocytes humains. Dans un modèle in vivo de l'angiogenèse, les extraits de baies ont inhibé de manière significative les transcriptions basiques de MCP-1 et NF- κ B inducibles (**Li and al., 2014**).

Egalement, d'autres travaux ont rapporté que l'extrait de la peau de raisin induit une apoptose des cellules tumorales de la prostate avec des taux élevés. L'extrait de gomme restant après la production du vin a inhibé les activités des métalloprotéinases matricielles-2 et -9 et a exprimé un effet antiprolifératif significatif sur les cellules d'adénocarcinome du colon humain (Caco-2), ce qui impliquerait un sous-produit du vin qui aiderait à lutter contre la carcinogenèse. Les molécules phénoliques du jus de raisin inhibent de manière significative la formation d'adduits d'ADN induite par un cancérigène dans le modèle de rat et ont inhibé la synthèse de l'ADN dans les cellules cancéreuses du sein (**Xia et al., 2010**).

Le trans-resvératrol inhibe la cyclo-oxygénase, l'ornithine décarboxylase et l'angiogenèse pour inhiber l'initiation de la croissance des tumeurs (**Collin et Crouzet, 2011**).

Les cellules 4T1 du carcinome mammaire métastatique de souris traitées à l'EGCG du thé vert ont montré un niveau réduit d'expression de Bcl-2, qui est un suppresseur de l'apoptose (**Saeed et al. 2017**).

3.1.5.3. Activité anti-inflammatoire

Les flavonoïdes altèrent la synthèse des éicosanoïdes (médiateurs de l'inflammation). Ils diminuent le rapport leucotriène/prostacycline en modifiant l'activité lipoxygénasique (**Collin et Crouzet, 2011**).

Des études ont montré que les flavonols, les flavanols et les procyanidines ont une activité anti-inflammatoire. Ils inhibent l'inflammation de l'oreille de souris, l'œdème et l'infiltration de leucocytes polymorphonucléaires induite par l'acétate de 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acétate (**Xia, 2010**).

Les procyanidines pourraient inhiber la libération des facteurs de proinflammation. Des chercheurs ont utilisé des tests de chondrocytes humains pour prouver cela. Après un traitement avec une combinaison d'extrait de vin de raisin et d'IL-1b, une diminution notable a été détectée dans la concentration d'oxyde nitrique, de prostaglandines E2 et d'espèces réactives d'oxygène dans la culture de chondrocytes humains, par rapport aux groupes témoins, et les effets étaient égaux ou supérieurs à celui de l'indométhacine (**Xia, 2010**).

L'acide hydrocafféique, l'acide dihydroxyphénylacétique et l'acide hydroferulique pourraient inhiber plus de 50% de la prostaglandine E-2 (**Li and al., 2014**). De plus, il a été démontré qu'EGCG du thé supprime la production de NO en inhibant l'expression de l'oxyde nitrique synthase inductible dans les chondrocytes humains induits par les LPS / cytokines et dans les macrophages murins induits par les LPS / cytokines en bloquant l'activation de NF-kB (**Novilla et al., 2017**).

3.1.5.4. Activité antioxydante

Les activités antioxydantes ont été largement étudiées, y compris le piégeage des radicaux libres, l'inhibition de l'oxydation des lipides, la réduction de la formation d'hydroperoxyde, etc (**Li and al., 2014**). Ils peuvent également agir comme des antioxydants grâce à leur capacité de complexer les ions métalliques (**Collin et Crouzet, 2011**).

Les études scientifiques ont montré que les polyphénols de l'olive ont diminué les niveaux de LDL oxydé dans le plasma et ont eu une incidence positive sur plusieurs biomarqueurs de lésions oxydatives (**Li and al., 2014**).

La consommation d'un repas riche en polyphénols, fournis des noix ou des amandes, augmente les concentrations plasmatiques de polyphénols, la capacité antioxydante totale et réduit la peroxydation lipidique plasmatique (**Li and al., 2014**).

Selon certains travaux, les phénylpropanoïdes glycosides des feuilles de *Marrubium vulgare* sont capables d'inhiber in vitro l'oxydation des LDL par le cuivre Cu²⁺ et un générateur des

radicaux libres : le 2,2'azobis-2-méthylpropionamide (AAPH). De plus, ils préservent l'aspect morphologique de cellules endothéliales de l'aorte bovine durant leur incubation avec des LDL modifiées par la myéloperoxydase (effet cytoprotecteur) : baisse de la fuite extracellulaire du lactate déshydrogénase, maintien de l'activité réductrice des mitochondries et réduction de l'accumulation d'hydroperoxydes (**Ghedadba et al., 2015**).

De nombreux polyphénols éliminent les radicaux libres à travers le mécanisme de transfert d'atomes d'hydrogène parce que des énergies supérieures sont impliquées dans le processus de transfert d'électrons unique. Les polyphénols pourraient chélater des métaux de transition à travers leurs groupes OH multiples et la fraction carbonyle, lorsqu'ils sont présents (**Li and al., 2014**).

En outre, les extraits d'éthanol des graines de raisin et de framboises noires de Chardonnay ont été évalués pour leurs capacités à supprimer l'oxydation des lipides, préserver les acides gras importants et inhiber la croissance microbienne. Les deux extraits de graines testés ont supprimé l'oxydation des lipides et le développement de la rancidité de l'huile de poisson. L'extrait de semence de framboise noire a considérablement réduit la dégradation des acides gras polyinsaturés n-3 biologiquement importants dans des conditions oxydatives accélérées (**Li and al., 2014**).

Il a été démontré que les polyphénols ont une action protectrice chez les mammifères et les cellules bactériennes contre la cytotoxicité induite par le peroxyde d'hydrogène, avec notamment des composés phénoliques de type flavonoïde, tels que la quercétine, la catéchine et d'autres polyphénols comme les esters d'acide gallique et d'acide caféique (**El-Haci et al., 2012**).

3.1.5.5. L'activité antibactérienne

De récentes études, ont montré que les flavonoïdes inhibent la libération de facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*. Il a été constaté que l'épigallocatechine empêche la sécrétion de la coagulase et l' α -toxine (**Ghedadba et al., 2015**).

L'activité antibactérienne de la quercétine et de la naringénine envers *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *E. coli* et *Pseudomonas aeruginosa* a été relatée par de nombreux travaux (**Collin et Crouzet, 2011**). Une activité antifongique a été également détectée pour les stilbènes. Le *trans*-resvératrol, par exemple, inhibe la germination de solutions de conidies de *Botrytis cinerea* (**Collin et Crouzet, 2011**).

La déstabilisation de la membrane externe des microorganismes Gram-négatifs, ainsi que les interactions avec la membrane cellulaire peuvent être l'un des mécanismes spécifiques de l'action antibactérienne (**Li et al., 2014**).

Ainsi, Les polyphénols ont pu supprimer un certain nombre de facteurs de virulence microbienne, tels que la réduction de l'adhérence des ligands hôtes, l'inhibition de la formation du biofilm, la neutralisation des toxines bactériennes et la synergie des antibiotiques (**Li et al., 2014**).

Le polyphénol du thé «EGCG» possède un large spectre antifongique et antimicrobien tel qu'un antifongique (*Candida spp*), dermatophytes (*Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum*), antibactérien (*Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline et *Stenotrophomonas maltophilia*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori* , *Streptococci spp.*, *Clostridium spp.*, *Bacillus cereus*, *Salmonella spp.*, *Mycoplasma pneumonia*) et antiviral [*Orthomyxoviridae* (Influenza virus) et *Flaviviridae* (hépatite C), virus de l'hépatite B, virus de l'immunodéficience humaine et adenovirus] (**Das et al., 2014**).

L'action des extraits de plantes à forte teneur en polyphénols est basée sur leurs propriétés antiadhésives contre les bactéries buccales spécifiques. Ce qui favorise leur élimination mécanique. Cependant, plusieurs mécanismes d'action pour ceux-ci ont été décrits, y compris les effets antimicrobiens, l'inhibition des activités enzymatiques liées à la survie bactérienne, la perturbation de la formation de biofilm et la réduction de la production d'acide bactérien (**Esteban-Fernandez et al., 2017**).

3.2. Les huiles essentielles

L'huile essentielle (HE), ou essence végétal, se définit comme étant un liquide hydrophobe contenant des composés odoriférants volatils sécrétés par la plante (**Fernandez et Chemat, 2012**). Le terme « huiles » vient de leur capacité à se solubiliser dans les graisses, alors que le terme « essentielles » désigne l'odeur dégagée par la plante productrice. Les huiles essentielles (HE) sont des complexes naturels de molécules volatiles et odorantes synthétisées par les plantes aromatiques comme métabolites secondaires.

Ces plantes se caractérisent par la présence de structures sécrétrices des HE bien spécialisées telles que les poils sécréteurs (Lamiaceae), les poches sécrétrices (Myrtaceae) et les canaux sécréteurs (Apiaceae). Ces structures dotées d'un caractère physiologique sécrétoire bien défini, qui diffèrent selon l'organe végétal en question. Ces structures sont également impliquées dans le stockage des HE (**Bouyahya et al., 2016**).

Ce mélange complexe de diverses molécules (alcools, terpènes, cétones, etc.) est obtenu par distillation à la vapeur d'eau, expression ou distillation sèche (**Fernandez et Chemat, 2012**).

3.2.1. La composition chimique des huiles essentielles

L'HE peut contenir approximativement 300 molécules ; cependant, la plupart des huiles comportent 20 à 60 molécules. Les composés trouvés dans les HE appartiennent à des classes chimiques variées (**Bouyahya et al., 2016**) (Tableau n° 3).

3.2.1.1. Classe des terpènes et terpénoïdes

Elle comprend les monoterpènes (dix atomes de carbone dans la molécule), les sesquiterpènes (15 atomes de carbone), les diterpènes (20 atomes de carbone) (**Bouyahya et al., 2016**). Les terpènes sont des molécules composées d'un nombre variable d'unités d'isoprène (**Joualt, 1986**). La combinaison séquentielle des unités basiques à cinq carbones nous permet de reconnaître les catégories familières de C₁₀ (mono-), C₁₅ (sesqui-), C₂₀ (di-), C₃₀ (tri-), C₄₀ (Tétra-) et C > 40 (poly) terpénoïdes (**Langenheim, 1994**).

3.2.1.2. Classe des phénylpropanoïdes

Ce groupe de dérivés du phénylpropane (C₆H₅-CH₂-CH₂-CH₃) est moins fréquent (tableau n°3). La biosynthèse concerne le précurseur de cette série qui est l'acide shikimique (ou acide trihydroxy-3,4,5-cyclohexane-1-carboxylique) qui conduira aux dérivés de l'acide cinnamique C₆H₅-CH=CH-COOH. Ce deuxième groupe est constitué par : des aldéhydes (par exemple, le cinnamaldéhyde) et des dérivés méthoxylés, ainsi que des allylphénols (par exemple, l'eugénol), des propénylphénols (par exemple, l'anéthole). Il existe aussi des lactones ou esters cycliques (par exemple, la coumarine) formés à partir de dérivés de l'acide cinnamique. Parfois, la chaîne aliphatique est réduite à un seul atome de carbone (par exemple, la vanilline) (**Bouyahya et al., 2016**).

3.2.1.3. Composés nitriques et sulfuriques

Ces composés proviennent le plus souvent de la dégradation de molécules peu ou pas volatiles. Par exemple, l'oxydation des acides linoléique et linoléinique conduit à des peroxydes instables qui, à leur tour, après dégradation, vont donner des alcools, des aldéhydes et des acides de masse moléculaire plus petite. Les acides organiques sont rarement présents dans les HE, ils réagissent avec les alcools pour former des esters. Les carotènes se décomposent en ionones. Les composés azotés qui contiennent du soufre sont rares dans les HE (**Bouyahya et al., 2016**).

3.2.2. Les voies de biosynthèse des huiles essentielles

Les constituants des HE sont issus de multiples voies de biosynthèse qui opèrent dans des compartiments cellulaires différents. Ce sont des voies métaboliques intermédiaires des principaux constituants cellulaires (sucres, lipides et les acides aminés) (figure n°16).

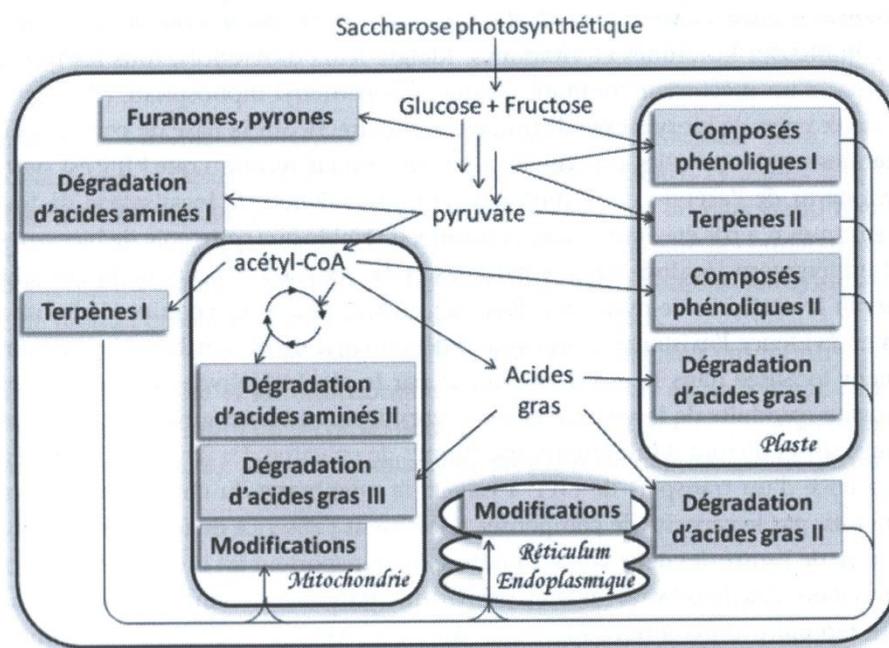


Figure n° 16: Localisation cellulaire des principales voies de synthèse des HE chez les végétaux (Fernandez et Chemat, 2012)

Deux principales voies sont à la base de la synthèse des HE. La voie de l'acide mévalonique (MVA) qui a lieu dans le cytoplasme, la mitochondrie et le réticulum endoplasmique. La seconde voie est le phosphate déoxyxylulose ou le méthylérythritol (MEP) et se déroule en niveau des plastides (Bouyahya et al., 2016).

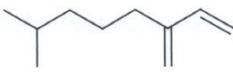
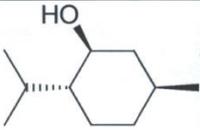
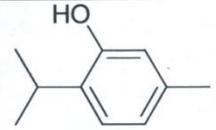
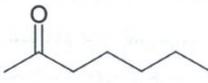
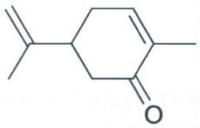
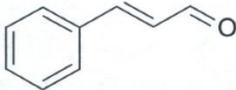
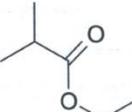
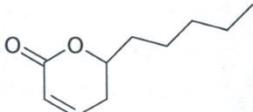
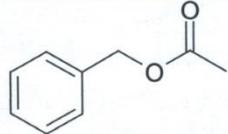
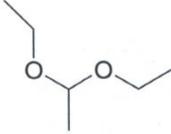
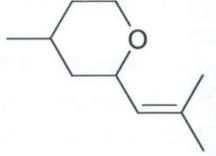
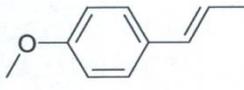
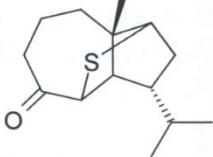
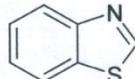
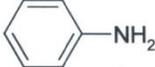
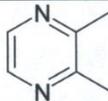
3.2.3. Les activités biologiques des huiles essentielles

3.2.3.1. Activité antioxydante

Les huiles essentielles sont douées d'un pouvoir antioxydant comme le montrent plusieurs travaux de recherche (Emami et al., 2011). En effet, les composés phénoliques des HE (thymol et carvacrol), grâce à leurs propriétés d'oxydoréduction, agissent en tant qu'agents réducteurs, donateurs de l'hydrogène et de l'oxygène singulier.

Des chercheurs ont montré que l'importante activité antioxydante des HE est due principalement à la richesse de certaines essences en thymol (Amarti et al., 2011).

Tableau n° 3: Principales familles de constituants des huiles essentielles et exemples de composition (Fernandez et Chemat, 2012)

	Type de chaîne		
	Linéaire	Cyclique	Aromatique
Hydrocarbure			
	myrcène mastic, céleri	limonène citrus	p-cymène origan, thym
Alcool			
	(Z)-hexèn-3-ol moutarde, ylang-ylang	menthol menthe	thymol thym, origan
Carbonyle			
	heptan-2-one gingembre	carvone graine de carvi, menthe	cinnaldéhyde cannelle
Ester / lactone			
	isobutyrate d'éthyle myrte	massoïa lactone bois de massoïa	acétate de benzyle ylang-ylang
Éther			
	1,1-diéthoxyéthane rose	oxyde de rose rose	anéthol badiane
Soufré			
	trisulfure de diméthyle ail, oignon, moutarde	mint sulfide rose, menthe, sauge	benzothiazole gingembre, rose chinoise
Azoté			
	aniline fenugrec		2,4-diméthyl pyrazine iris

Cependant, il a été prouvé que l'activité antioxydante des composés majoritaires testés séparément donne souvent des résultats inférieurs comparés à l'activité de la totalité de l'HE. En général, les interactions synergiques entre les différents constituants d'une HE sont à l'origine d'un pouvoir antioxydant beaucoup plus important. En outre, certains constituants des HE autres que les composés phénoliques tels que le γ -terpinène possèdent aussi une forte activité antioxydante (**Amarti et al., 2011**).

3.2.3.2. Activité antibactérienne

Les huiles essentielles ont de nombreuses activités antiseptiques (**Benkherara et al., 2015**) contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne, comme les bactéries endocanalaire ou la microflore vaginale, et d'origine fongique, comme les dermatophytes (**Mehani et al., 2016**). Elles présentent également des propriétés cytotoxiques qui les rapprochent donc des antiseptiques et désinfectants en tant qu'agents antimicrobiens à large spectre (**Billerbeck, 2007**).

Certaines molécules qui figurent dans la composition des huiles essentielles comme par exemple le carvacrol, le camphre, β -thujone et thymol ont été citées par la littérature scientifique comme pouvant être à l'origine de ces potentiels antibactérien et antifongique (**Bekhechi et al., 2008 ; , Sekkat et al., 2015 ; , Adida et al., 2016**).

D'autres auteurs ont affirmé que l'activité intrinsèque d'une huile pourrait se rapporter à la structure chimique de ses composants, aux proportions dans lesquelles ils sont présents et aux interactions entre eux selon qu'ils sont testés seuls ou en synergie (**Sekkat et al., 2015**).

3.2.3.3. Activité anticancéreuse

Les huiles essentielles (HE) et leurs constituants ont montré des activités anticancéreuses puissantes in vitro et in vivo (figure n°17). Cependant, les mécanismes d'action sont encore peu étudiés et moins connus (**Bouyahya et al., 2016**).

Des études ont montré la cytotoxicité des HE de nombreuses plantes aromatiques contre les lignées cellulaires du cancer de l'ovaire, les lignées tumorales des cellules de carcinome (HeLa), Adénocarcinome (A549) et de cellules fibroblastiques cancéreuses de fœtus humain (MRC-5). Cette activité cytotoxique est fortement liée à la présence des composés comme les phénols (tels que le carvacrol, le thymol et l'eugénol), les alcools (tels que le linalool) et les aldéhydes (tels que le cinnamaldéhyde) (**Bouyahya et al., 2016**).

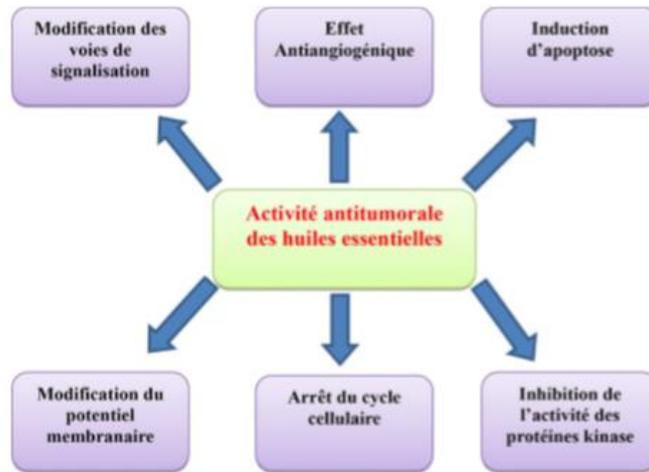


Figure n° 17 : Mécanismes d'action antitumorale des HE (Bouyahya *et al.*, 2016).

3.2.3.4. Activité anti-inflammatoire

Les mécanismes anti-inflammatoires des huiles essentielles sont multiples et se superposent obtenant un effet anti-inflammatoire général. Les huiles essentielles bloquent la formation et/ou la sécrétion des médiateurs de l'inflammation comme l'histamine, les cytokines pro-inflammatoires, les prostaglandines, les leucotriènes, l'oxyde d'azote et les radicaux libres produits par les neutrophiles (Inouye et Abe, 2007).

Chapitre 4

MATÉRIEL ET MÉTHODES

4.1. Matériel végétal

Des échantillons de trois plantes: *Artemisia herba-alba*, *Phlomis crinita* et *Opuntia ficus indica* ont été récoltés en Algérie durant le mois de mai, dans les régions suivantes : Boussada (W. de M'sila), Souk El Khemis, Lakhddaria (W. de Bouira), respectivement.

L'identification des plantes a été confirmée par les professeurs Amirouche R. et Amirouche N. du laboratoire d'Ecologie génétique de l'USTHB (Université des Sciences et des Technologies Houari Boumediene) à Alger.

Fraichement récoltés, les parties aériennes (tige, feuille et fleurs) d'*Artemisia herba-alba* et de *Phlomis crinita* ont été séchées à l'ombre dans un endroit sec et aéré. Après séchage, les échantillons sont récupérés dans des sacs propres en papier.

Une autre plante a fait l'objet de ce travail, il s'agit de la feuille du théier « *Camellia sinensis* » fabriquée pour le commerce (TCHICO) sous forme de thé vert.

4.2. Micro-organismes choisis

Les bactéries choisies par cette étude sont le *Porphyromonas gingivalis* et *Prevotella intermedia* vu qu'ils sont considérés comme les agents causaux majeurs dans l'initiation et la progression de la maladie parodontale (**Gianmaria Ferrazzano et al., 2011; Nagano et al., 2015**).

La souche de référence ATCC 33277 de *Porphyromonas gingivalis* nous a été gracieusement fournie par le laboratoire du Centre National de Référence Anaérobie et Botulisme, Institut Pasteur, Paris. De même, des souches cliniques de *Porphyromonas gingivalis* et de *Prevotella intermedia* ont été isolées à partir de patients atteints de maladies parodontales (chronique et agressive) au niveau du service stomatologie au CHU Mustapha Bacha à Alger, puis identifiées et conservées.

Les souches sont cultivées et isolées sur gélose Columbia ANC additionnée de 5% de sang de mouton. La croissance est effectuée à 37°C en anaérobiose pendant 5 jours (**Chardin et al., 2006**).

4.3. Analyses physicochimiques des plantes

4.3.1. Le taux d'humidité et la matière sèche

Le taux d'humidité de la plante a été déterminé par le procédé de séchage à l'étuve selon la norme AFNOR (NF ISO 712, 1989).

Le principe repose en un étuvage à température de 130 à 133°C et à pression atmosphérique pendant 2 heures 40 minutes. La perte de masse observée est équivalente à la quantité d'eau présente dans la plante.

Le taux d'humidité est donné par la relation:

$$H = (M_0 - M_1 / M_0) \times 100$$

H= Taux d'humidité exprimé en pourcentage.

M₀= Masse de la prise d'essai

M₁= Masse de la prise d'essai, après étuvage

Le taux en matière sèche est exprimé par la relation suivante:

$$MS = 100 - H$$

4.3.2. Les cendres (AFNOR, 1988) (NF V03-922, 1967)

La détermination de la teneur en cendre consiste à l'incinération de la plante à 550°C ± 16°C, dans un four à moufle à chauffage électrique jusqu'à masse pratiquement constante.

Expression des résultats:

$$P = (M_2 - M_0) \times 100 / (M_1 - M_0)$$

P: Pourcentage du taux de cendres.

M₀: Masse en gramme, de la capsule d'incinération.

M₁: Masse en gramme, de la capsule d'incinération chargée avec la prise d'essai.

M₂: Masse en gramme, de la capsule d'incinération avec les cendres.

4.3.3. Analyse par spectroscopie infrarouge de la plante sèche

-Principe

La spectroscopie IR est une méthode spectrale d'analyse qui permet de déterminer les fonctions chimiques qui sont présentes dans la structure d'une molécule et qui apparaissent sous forme de bandes d'absorption dans l'infrarouge.

Un échantillon irradié par une lumière infrarouge peut absorber partiellement et sélectivement ce rayonnement. Cette absorption est caractéristique des liaisons chimiques et physicochimiques du produit considéré. Le spectre infrarouge est constitué de bandes que l'on appelle bandes d'absorption (Bertrand et al., 2006).

L'analyse chimique par spectrophotométrie infrarouge repose sur l'acquisition et le traitement des données spectrales d'absorption lumineuse concernant les molécules constitutives des produits analysés. Lorsque des radiations lumineuses entrent en contact avec de la matière, elles peuvent aussi bien être absorbées que transmises et réfléchies (**Bertrand et al., 2006**).

- 1 g de l'échantillon a été déposé dans un spectrophotomètre à infrarouge (FT/IR-4200 type A, avec un nombre de série de C077561018 (tableau n° 4). Le tableau suivant représente les caractéristiques de cet appareil.

Tableau n°4 : Les caractéristiques de l'appareil FTIR utilisé

Light Source	Standard
Detector	TGS
Accumulation	Auto (42)
Resolution	4 cm ⁻¹
ZeroFilling	On
Apodization	Cosine
Gain	Auto (4)
Aperture	Auto (7.1 mm)
Scanning Speed	Auto (2 mm/sec)
Filter	Auto (30000 Hz)

4.4. Extraction des huiles essentielles

4.4.1. Extraction par hydro distillation

Cette méthode consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter dans un alambic rempli d'eau distillée qui est ensuite portée à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par différence de densité (**Bekhechi et Abdelouahid, 2010**).

La méthode d'extraction des huiles essentielles de la plante *Artemisia herba alba* a été réalisée comme suit:

- 50g de la plante (la partie aérienne) sont introduites dans un ballon de 1 litre rempli d'environ 400 ml d'eau distillée. Le tout est porté à ébullition (100°C) pendant cinq heures. Les vapeurs riches en huile essentielle remontent et se condensent dans le réfrigérant (fig. n° 18).
- Le distillat est versé dans une ampoule à décanter (fig. n° 19), pour séparer la phase organique de la phase aqueuse en ajoutant quelque ml de diéthyl-éther. Laisser quelques minutes puis récupérer l'huile essentielle avec le solvant.

Pour séparer le mélange (l'huile + solvant) il est nécessaire d'utiliser une ampoule à décanter.

L'huile essentielle récupérée a été conservée dans le réfrigérateur à + 4 C° dans des flacons en verre opaque hermétiquement fermés.



Figure n°18: Photo représentant le montage de l'hydrodistillation



Figure n°19:Photo de l'ampoule à décanter représentant les deux phases organique et aqueuse

4.4.2. Caractérisation des huiles essentielles

4.4.2.1. Caractéristique organoleptique

L'aspect, la couleur, l'odeur

4.4.2.2. Propriétés physico-chimiques

4.4.2.2.1. L'indice de réfraction (AFNOR NF ISO 280: 1999 (75-112))

C'est le rapport entre le sinus des angles d'incidence et de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'HE maintenue à une température constante (Boukhatem et al., 2010). Mesuré directement à l'aide d'un réfractomètre digital Brix.

4.4.2.2.2. La densité relative (AFNOR NF ISO 280: 1999 (75-112))

C'est le rapport de la masse d'un certain volume d'huile essentielle à 20 °C à la masse d'un volume égal d'eau distillée à 20°C. Brièvement, à l'aide d'un pycnomètre de capacité de 5 ml, on pèse successivement des volumes égaux d'huile essentielle et d'eau distillée à température ambiante (20°C).

La densité relative est donnée par la formule :

$$d = (m_2 - m_0) / (m_1 - m_0)$$

Avec:

m₀: est la masse en gramme du pycnomètre vide.

m₁: est la masse en gramme du pycnomètre rempli d'eau distillée.

m₂: est la masse en gramme du pycnomètre rempli d'huile essentielle.

4.4.2.2.3. L'indice d'acide NF ISO 1242: 1999 (T 75-103)

C'est le nombre de mg de KOH nécessaire à la neutralisation des acides libres contenus dans 1g d'HE. Les acides libres sont neutralisés par une solution d'éthanol titrée de KOH.

Mode opératoire

- Préparer une solution de KOH de 0,05N.
- Dissoudre dans un bécher 1g de l'HE avec 5ml de l'éthanol (95%).
- Après la dissolution, ajouter quelques gouttes de phénolphtaléine et titrer avec le KOH jusqu'au virage de la couleur au rose.
- Noter le volume de KOH consommé.
- Préparer un essai blanc sans le corps gras (HE).

L'indice d'acide est déterminé par la relation suivante:

$$IA = (56,11 (N \times V)) / m$$

Avec:

N: la normalité de KOH.

V: volume de KOH utilisé pour le titrage.

m: la masse de l'huile essentielle.

4.4.2.2.4. L'indice d'ester (AFNOR NF T 75-104: 1994)

C'est le nombre de mg de KOH nécessaire à la neutralisation des acides libérés par l'hydrolyse des esters contenus dans 1g d'HE.

Mode opératoire

Le mélange obtenu lors de la détermination de l'indice d'acide est chauffé à reflux avec 25ml de potasse pendant une heure. Après chauffage et baisse de la température, la solution est dosée avec l'acide chlorhydrique jusqu'au virage de la couleur de la solution au jaune.

En parallèle, nous avons effectué un essai blanc dans les mêmes conditions mais sans le corps gras.

L'indice d'ester est déterminé par la relation suivante:

$$IE=28,05(V_0 - V_1/m) - IA$$

Avec:

V_0 : volume en millilitre de la solution d'acide chlorhydrique utilisée pour l'essai à blanc.

V_1 : volume en millilitre de la solution d'acide chlorhydrique utilisée pour la détermination de l'indice d'ester.

m: masse de la prise d'essai (g).

IA: la valeur d'indice d'acide déterminée.

4.4.2.2.5. Le point de congélation

Le point de congélation d'une huile essentielle est la température constante ou maximale observée pendant la phase de la libération de la chaleur de solidification, lorsque cette huile essentielle à l'état liquide est refroidie.

L'huile essentielle est mise dans des tubes à essais à l'intérieur d'un congélateur, accompagnés d'un thermomètre, d'où l'observation des variations de température accompagnant la solidification de l'huile.

4.4.2.2.6. Détermination du pH de l'huile essentielle

Plonger l'électrode du pH mètre dans un bécher rempli avec l'huile essentielle.

4.4.2.3. Analyses physicochimiques des huiles essentielles**4.4.2.3.1. Spectroscopie infrarouge par FTIR****- L'échantillon**

Les mesures infrarouges par l'FTIR sont effectuées sur un échantillon d'huile essentielle de la plante *Artemisia herba-alba*. Le nom du modèle de l'appareil utilisé est FT/IR-4200 type A, avec un nombre de série de C077561018.

4.4.2.3.2. Chromatographe en phase gazeuse-spectrométrie de masse (GC/MS) (HP 6890Agilent)

Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse (CPG/SM) permet d'effectuer simultanément la séparation et l'identification des différents constituants d'un mélange complexe.

Les analyses chromatographiques de l'HE d'*Artemisia herba-alba* ont été effectuées sur un chromatographe en phase gazeuse à régulation électronique de pression de type Hewlett Packard 6890, équipé d'une colonne capillaire apolaire HP 5%(5 % diphenyl, 95 % diméthylpolysiloxane) (30 m x 0,25 mm diamètre externe) avec une épaisseur du film de 0,25 µm, d'un détecteur Mass réglé à 230 °C et alimenté par un gaz vecteur Hélium 6.0 pur et un injecteur split 1/20 réglé à 250 °C. Le volume injecté est de 0.2 µl. Le mode d'injection est split (rapport de fuite: 1/20 débit: 0.5 ml/min).

La température de la colonne est programmée de 45 à 280 °C à raison d'une montée de 45 °C/8 min et un palier de 2 minutes à la température finale. L'appareil est piloté par un système informatique de type « HP Chem Station », gérant le fonctionnement de l'appareil et permettant de traiter les données.

L'identification des constituants s'effectue à l'aide d'un logiciel piloté par une banque de données Wiley et sur la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse à impact électronique.

4.5. Préparation des extraits de plantes

4.5.1. Préparation du gel d'*Opuntia ficus-indica*

Les raquettes d'*O. ficus-indica* ont été nettoyées, séchées. Après avoir éliminé les épines, elles ont été broyées jusqu'à l'obtention d'un gel visqueux et homogène.

4.5.2. Extraction en milieu aqueux

Des extraits aqueux (EAq) ont été préparés à partir des différents organes cités ci-dessus d'*Artemisia herba-alba* et de *Phlomis crinita* et du thé vert *Camellia sinensis* fabriquées dans le commerce à partir des feuilles du théier *Camellia sinensis*.

L'extraction aqueuse a été effectuée par macération du matériel végétal préalablement broyé, dans 100ml d'eau distillée et stérile pendant 15 mn à 80 °C.

4.5.3. Etude phytochimique

4.5.3.1. Dosage des polyphénols totaux de chaque extrait de plante

L'analyse quantitative des polyphénols totaux (PPT) est déterminée par spectrophotométrie selon la méthode de Folin-Ciocalteu par le réactif phosphotungsto-molybdique de couleur jaune qui est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique (Boizot et Charpentier, 2006; Nunzia Cicco et al., 2009).

-Principe

Ce dosage repose sur l'oxydation en milieu basique des fonctions oxydables des polyphénols par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$) qui est réduit en mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration produite dont l'absorbance maximum est comprise entre 725-760 nm, est proportionnelle aux taux des composés phénoliques oxydés présents dans le milieu (Collin et Crouzet, 2011).

-Mode opératoire

0.5 ml de chaque extrait est pipeté dans un erlenmeyer de 50 ml contenant 2.5 ml de Folin-Ciocalteu, 30 ml d'eau distillée et 7.5 ml de Na_2CO_3 (20%). Compléter le volume avec de l'eau distillée. Après 2 heures, l'absorbance de cette solution de coloration bleue est mesurée à 765 nm (Rusack et al., 2008).

-La courbe d'étalonnage

Les taux de polyphénols totaux (PPT) dans nos extraits ont été calculés à partir d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y = ax+b$) établie avec des concentrations précises d'une solution étalon d'acide gallique.

Pour réaliser la courbe d'étalonnage, l'acide gallique est utilisé à une concentration de 0.005-0.05 mg/ml. Les résultats sont exprimés en mg d'acide gallique par gramme d'échantillon (Turkmen, 2006).

4.6. Prélèvement, isolement et identification des souches cliniques de *Porphyromonas gingivalis* et *Prevotella intermedia*

4.6.1. Prélèvement, isolement et identification de souches cliniques

4.6.1.1. Prélèvement et isolement

Une quarantaine de prélèvements ont été effectués sur des patients des deux sexes, représentant une tranche d'âge allant de 12 ans à 55 ans atteints de maladies parodontales (agressive et chronique) suivis au niveau du service de stomatologie de l'hôpital Mustapha

Bachaà Alger. A l'aide d'une pince stérile, des cônes de papier absorbant stérile ont été introduits à l'intérieur de la poche parodontale de chaque patient. Une fois le suc parodontal absorbé, le cône est transféré rapidement dans des tubes à essai contenant un milieu de transport exempt d'oxygène adapté pour les germes anaérobies.

Les souches sont cultivées et isolées sur gélose Columbia ANC supplémentée de 5% de sang de mouton. La croissance est effectuée à 37°C en anaérobiose pendant 5 jours (**Chardin et al., 2006**).

4.6.1.2. Identification des souches

Après ensemencement de la culture prélevée et incubation de 5 jours, une culture mixte des bactéries présentes dans la poche parodontale a été développée et permet d'obtenir toutes les souches bactériennes qui colonisaient la poche parodontale, avec l'apparition des colonies pigmentées en noir, qui représentent les bactéries recherchées. Après plusieurs repiquages sur gélose Columbia, on obtient des cultures pures de colonies pigmentées en noir.

L'identification de la souche *P. gingivalis* est effectuée par PCR (polymerase chain reaction) en référant la souche de référence *P. gingivalis* ATCC33277. Quant à la souche *P. intermedia*, l'identification est réalisée par la technique MALDI-TOF/MS. L'identification de la souche *P. intermedia* a été confirmée par la méthode de séquençage de l'ARN 16S.

– Identification phénotypique

1- Coloration de Gram

Elle permet de confirmer l'appartenance de la souche au groupe bactérien Gram positif ou Gram négatif et de préciser sa forme.

2- Galerie Api 20A

Le système Api 20A permet de rechercher rapidement et facilement 21 caractères pour l'identification biochimique des bactéries anaérobies. Il comporte 20 microtubes contenant des substrats réactionnels déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

Les résultats sont lus à l'aide du tableau de lecture fourni avec le kit et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique.

3- L'antibiogramme

C'est une technique qui permet de déterminer la sensibilité des souches isolées vis-à-vis de plusieurs antibiotiques.

Identification géotypique

1- Identification par PCR

➤ Extraction de l'ADN

Cette étape est réalisée par des mini kits d'extraction d'ADN de type Invitex en utilisant la technologie RTP. C'est une technique rapide qui permet un isolement efficace de l'ADN de haute qualité à partir des espèces bactériennes.

Etape de lyse : Elle consiste à mettre en contact la suspension bactérienne avec un réactif contenant des lysozymes pour lyser la paroi cellulaire, du tampon de lyse et de la protéinase K pour digérer les protéines.

Etape de liaison : Avec l'addition du tampon de liaison au lysat, les conditions optimales de liaison seront ajustées. Chaque lysat est ensuite appliqué à un filtre Spin RTA et l'ADN génomique est adsorbé sur cette membrane. Le lysat passe à travers le filtre par la force centrifuge.

Pour éliminer les contaminants résiduels, on utilise des tampons de lavage et l'ADN génomique reste lié à la membrane.

Etape d'élution de l'ADN pur :

L'ADN génomique pur est élué à travers un filtre Spin par un tampon d'élution (préciser) préchauffé ou de l'eau. Ensuite, il sera conservé au congélateur à -20°C.

➤ Amplification par PCR

Deux amorces spécifiques de *P. gingivalis* décrites par **Matto et al., 1998** et **Pfan et al., 2005** sont utilisées pour amplifier un fragment de 404 pb du gène codant pour l'ARNr 16S par PCR :

Amorce 1: 5' –AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG-3'

Amorce 2: 5' –ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT-3'

Les réactions d'amplification ont été réalisées dans un volume total de 50 µl, le mélange réactionnel contient :

-0.2 mM de chaque triphosphate desoxynucléoside (dATP, dTTP, dCTP et dGTP),

- 10 x taq tampon,

-1.5 mM de MgCl₂,

- 1 μ M de chaque primer,
- 1 μ l de taq DNA polymérase 2.5U,
- 5 μ l de la solution d'ADN à amplifier de chaque souche,
- 0.5 μ l de l'huile minérale.

L'amplification est réalisée dans un thermocycleur de type Tech Gene, modèle FTGENE5D, selon les paramètres suivants :

- Une étape initiale de dénaturation à 95°C pendant 1 mn,
- 36 cycles d'amplification à 95°C pendant 30 s, 65°C pendant 1 mn et 72°C pendant 1 mn.
- Une étape finale d'extension à 72°C pendant 2 mn.

Le *P. gingivalis* ATCC 33277 est utilisé comme témoin positif et 5 μ l d'eau distillée utilisée comme témoin négatif.

➤ **Electrophorèse**

Les bandes d'ADN obtenues ont été déposées sur plaque du gel électrophorèse. Après la migration, la plaque d'électrophorèse a été photographiée sous illumination UV.

Préparation du gel

- 1% d'agarose dans le tampon TBE (1x),
- Additionner 10 μ l de SYBR Safe DNA gel (coloration pour visualiser l'ADN dans le gel d'agarose),
- Additionner à chaque amplifiât 0.5 μ g/ml de bromure d'éthydiuim,
- Couler la plaque d'électrophorèse,
- Déposer 10 μ l d'amplifiât dans chaque puit de la plaque d'agarose,
- Après la migration photographier la plaque d'électrophorèse sous illumination UV en utilisant le système Polaroid MP4.

2- Identification par la méthode de séquençage du gène codant pour de l'ARN 16S

La détermination des séquences est effectuée en utilisant les amorces de deuxième intention suivantes :

P 1848 : 5'- CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

P 1849 : 5'-CCCGGGATCCAAGCTTACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'

Cette technique se fait en six étapes :

Extraction d'ADN

Cette étape s'effectue sur paillasse

- Prendre 200 μ L d'InstaGene Matrix, agiter avant utilisation;
- Ajouter quelques colonies;
- Chauffer à 56°C pendant 20mn;
- Puis à 90°C pendant 10mn;
- Centrifuger pendant 5mn à 13000 rpm;
- Récupérer et conserver le surnageant qui contient l'ADN à -20°C.

Préparation du MIX : Cette étape s'effectue sous hotte à UV

Préparation de 40 ml du tampon initial (tableau n° 5)

Tableau n° 5: Composition du tampon initial

Réactifs	Quantité pour 40 ml
Eau distillée	34.5
Tampon 10x	4.5
MgCl ₂ 50mM	0.32
dNTP MIX 25mM	1.2

- Extraire 450 μ L de tampon initial auquel rajouter 4,5 μ L de primer 1 (forward) + 4,5 μ L de primer 2 (reverse) + 4,5 μ L de Taq polymérase. Cette composition constitue le Mix.
- Aliquoter le Mix à raison de 50 μ L dans 09 Micro eppendorf.

Pour réaliser l'identification, on doit rajouter, à ce stade l'ADN, à raison de 2 μ L. Cette manipulation se fait évidemment, sur paillasse.

Et c'est ainsi, qu'on passe à la 3^{ème} étape

Amplification : Programme 16S (tableau n°6)

Tableau n° 6: Programme de l'amplification de l'ADN 16S

Etape	Température	Durée	Nombre de cycle
Dénaturation initiale	95°C	240 sec	1
Dénaturation	94°C	30 sec	29
Hybridation	55°C	30 sec	29
Elongation	72°C	90 sec	29

Analyse des amplicons par électrophorèse sur gel d'agarose

Préparation du gel

- 2% d'agarose dans le tampon TBE (1x),
- Additionner 5µl de SYBR Safe DNA gel,
- Additionner à chaque amplifiât 5 µl de bromophénol à 3%,
- Couler la plaque d'électrophorèse,
- Déposer 10µl d'amplifiât dans chaque puit de la plaque d'agarose,
- La migration se fait par la mise en marche d'un générateur à 150 volts pendant 40 mn.

Lecture

La lecture du gel d'agarose se fait sur le Gel Doc.

1^{ère} PCR ARNr16S

Sur les neuf souches, nous avons identifié la présence de bandes d'ADN pour 04 souches uniquement: 00998, 00996, 00997, 01000.

2^{ème} PCR ARNr16S

Présence de bandes d'ADN après avoir dilué l'ADN au 1/10: 00995, 00994, 01002, 01001, 00999.

La taille attendue est environ 1400 pb.

Séquençage

Les amplicons de chaque souche sont envoyées pour le séquençage dans les tubes Eppendorf de 1,5µl + les primers 1 et 2 de 2^{ème} intention dilués au 1/10 dans de l'eau PPI (10 µl de Primer+ 40µl de l'eau PPI).

Bioinformatique

Les séquences doivent être alignées à l'aide du programme la Bio Edit puis le Blaster contre la base des données pertinente avec le programme le BIBI pour réaliser l'identification et l'arbre phylogénétique.

Identification protéomique

Identification par la technique MALDI-TOF MS (fig. n° 20)

Elle est basé sur l'ionisation par laser UV de l'analyte (toute substance contenant des cellules bactériennes ou fongiques entières), qui est incorporé dans une matrice appropriée sur une plaque cible (Mellmann et Müthing, 2013).

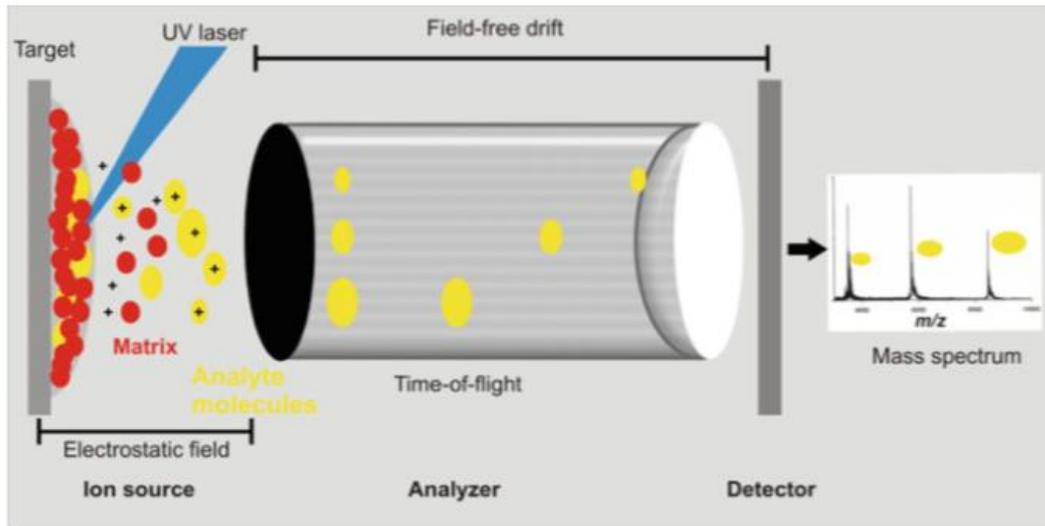


Figure 20 : Illustration schématique d'un spectromètre de masse à laser UV linéaire MALDI-TOF (Mellmann et Müthing, 2013).

Principe

Le spectromètre de masse MALDI-TOF est un spectromètre utilisant une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI = Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation) et un analyseur à temps de vol (TOF = Time-Of-Flight). L'échantillon est mélangé à la matrice et placé sur une lame. Le dépôt (ou spot) formé est appelé cible. Une source laser est dirigée sur la cible afin d'ioniser les molécules de l'échantillon. Les ions sont ensuite détectés en mesurant le temps que mettent les différentes particules à atteindre le détecteur. La vitesse de chaque particule dépend du rapport masse/charge. Les molécules plus grandes mettront plus de temps à atteindre le détecteur, tandis que les molécules plus petites arriveront plus vite. Une fois l'ion arrivé au détecteur, le signal est amplifié et envoyé à un ordinateur qui traite les données et donne les résultats sous forme de spectre (Cariello, 2012).

Les souches ont été analysés par MALDI-TOF MS, en utilisant un spectromètre de masse Microflex LT (BrukerDaltonics, Bremen, Allemagne). Le logiciel utilisé pour le contrôle de l'instrument était Flex Control 3.3 et Maldi Biotyper 3.1 (Bruker Daltonics, Allemagne) pour l'analyse des spectres et la comparaison avec la base de données. Des réglages par défaut (acquisition de spectres de masse en mode positif linéaire dans la gamme 2000-20000 Da, source d'ions 1 (IS1) 20kV, IS2 18.05kV, lentille 6.0kV, détecteur linéaire 2.560V) ont été appliqués.

Identification par dépôt directe de la colonie

Réactifs MALDI-TOF :

Matrice (α -cyano-4-hydroxycinnamique),

ACN,

TFA

Préparation de l'échantillon et analyse spectrométrique

- Prélever une colonie bactérienne avec une boucle stérile de 1 μ l et la déposer sur une puce MSP (MSP 96, Bruker Daltonics, Allemagne)

- Ajouter 1 μ l de la matrice (α -cyano-4-hydroxycinnamique dans une solution à 50% d'acétonitrile et 2,5% d'acide trifluoroacétique).

- Pour la calibration, faire un dépôt avec la souche *E. coli* dans le puits prévu à cet effet, puis déposer 1 μ l de matrice.

- Indiquer les emplacements de chaque échantillon sur la lame en spécifiant s'il s'agit de bactéries ou de levures car les spectres d'acquisition sont séparés dans deux bases de données différentes.

- Une fois la lame terminée, transférer les données de la Prep Station vers le Vitek MS, placer la lame sur le porte-lame, l'introduire dans le Vitek MS et lancer l'analyse (Cariello, 2012).

Les spectres ainsi obtenus, sont ajustés, alignés et analysés grâce au logiciel Biotyper qui calcule le taux de similarité des spectres. Ainsi, le résultat de l'identification apparaît sous la forme d'un score (tableau n° 7) d'homologie entre le spectre obtenu et les spectres de référence identifiés comme les plus proches. Le score est donné en Log de 0 à 3 (valeur de score) (Moussaoui, 2012, Riegel et al., 2016).

Tableau n° 7 : Signification des valeurs de score (échantillon standard)

Gamme	Description	Symboles	Couleur
2.300...3.000	Identification des espèces hautement probable	(+++)	Vert
2.000...2.299	Identification sécurisée du genre, identification probable des espèces	(++)	Vert
1.700...1.999	Identification probable du genre	(+)	Jaune
0.000...1.699	Identification non fiable	(-)	Rouge

4.7. Conservation des souches

- Faire bouillir le bouillon TY (5ml) pendant 20-30 mn pour faire échapper l'oxygène.
- Mettre 1 ml de glycérol dans les cryotubes.
- Racler une quantité importante de colonies dans le TY.
- Introduire le mélange à raison de 1 ml sur le glycérol.
- Conserver les cryotubes à -20°C pendant 1 h ensuite à - 80°C.

- Préparer au moins 4 cryotubes pour chaque souche.

4.8. Mise en évidence de l'activité antibactérienne des extraits végétaux

Pour mettre en évidence l'activité antibactérienne des extraits végétaux (extraits aqueux et HE), nous avons utilisé la méthode des disques.

Une série de concentrations en extraits aqueux (tableau n° 8) contenant des PPT (mg/ml) ont été utilisées pour mettre en évidence l'activité antibactérienne. Le choix de ces concentrations est basé sur des tests préliminaires effectués au laboratoire.

Tableau n° 8 : Les valeurs des concentrations en PPT (mg/ml) utilisées pour la mise en évidence de l'activité antibactérienne des extraits végétaux

Les végétaux	Concentration en polyphénols totaux (PPT) mg/ml					
	D1	D2	D3	D4	D5	D6
<i>Artemisia herba-alba</i> (EAq1)	0.028	0.058	0.119	0.251	0.498	1.004
<i>Opuntia. ficus-indica</i> (EAq2)	2.89	8.99	15.01	30	55.9	35.26
<i>Camellia sinensis</i> (EAq 3)	0.59	1.01	2.09	5.49	9.99	20.27
<i>Phlomis crinita</i> (EAq 4)	34.99	71.85	146.7	280.41	590.82	1080.21

4.8.1. Méthode des disques (Mbata et al., 2008)

Des disques de papiers absorbants stériles de diamètre de 9 mm sont imbibés de l'extrait végétal. Les boîtes de gélose Columbia sontensemencées sur la surface, à l'aide d'un écouvillon, d'une suspension bactérienne de 0.5 Mc Farland. Le disque de papier est placé au milieu de la boîte de Pétriensemencée. Cette dernière est incubée à 37°C pendant 5 jours.

4.9. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) (M11-A8)

La détermination de la CMI a été réalisée par la méthode de diffusion en agar (M11-A8)

4.9.1. Préparation de l'échantillon

Cas des extraits aqueux

Une série de dilutions successives (tableau n° 9) de raison ½ de la concentration mère en polyphénols totaux (PPT) des différents extraits d'*Artemisia herba-alba*, *Camellia sinensis*, *Phlomis crinita* et *O. ficus indica* est réalisée.

Tableau n° 9: Les différentes concentrations en polyphénols totaux des extraits végétaux utilisées pour déterminer la CMI pour les deux souches *P. gingivalis* et *P. intermedia*

Matériel végétal	Sol. Mère de PPT*mg/ml	d1	d2	d3	d4
<i>A. herba-alba (P. gingivalis)</i>	2.32	1.16	0.58	0.29	0.145
<i>A. herba-alba (P. ntermedia)</i>	10.04	5.02	2.51	1.255	0.627
<i>P. crinita</i>	11816.4	5908.2	2954.1	1477.05	738.525
<i>O. ficus indica</i>	2.4	1.2	0.6	0.3	0.15
<i>C. sinensis (P. gingivalis)</i>	219.6	109.8	54.9	27.45	13.725
<i>C. sinensis (P. intermedia)</i>	83.6	41.8	20.9	10.45	5.225

Solution mère de PPT*: solution de polyphénols totaux; d1, d2, d3, d4: dilutions

Cas de l'huile essentielle d'*Artemisia herba-alba*

Une série de dilutions a été préparée à partir de l'extrait brut de l'HE (solution mère S₀), au ½ (S₁), ¼ (S₂), 1/8 (S₃) et 1/16 (S₄). Les dilutions de l'huile essentielle se font dans le DMSO, les concentrations préparées sont: (tableau n° 10, 11)

Tableau n° 10 : Les différentes concentrations en HE d'*A. herba-alba* utilisées pour déterminer l'activité antibactérienne contre les deux souches *P. gingivalis* et *P. intermedia*

L'huile essentielle	Les concentrations de l'HE (g/ml)
Extrait brut (solution mère S ₀)	0.97
S ₁ (d ₁ =1/2)	0.48
S ₂ (d ₂ =1/4)	0.24
S ₃ (d ₃ =1/8)	0.12
S ₄ (d ₄ =1/16)	0.06

Tableau n° 11 : Les différentes concentrations en HE d'*A. herba-alba* utilisées pour déterminer la CMI pour les deux souches *P. gingivalis* et *P. intermedia*

L'huile essentielle brute (g/ml)	D1 (g/ml)	D2 (g/ml)	D3 (g/ml)	D4 (g/ml)	D5 (g/ml)	D6 (g/ml)
0.051	0.025	0.012	0.0063	0.0031	0,0016	0.00079

4.9.2. Méthode de diffusion en agar (M11-A8)

Couler les boites de dilution en agar

- 1- Etiqueter les boites de Pétri pour chaque agent antimicrobien à préparer, et distribuer les boites au niveau de la surface.
- 2- Pour chaque concentration préparée, ajouter 1 ml de sang de mouton laqué et 2 ml (10X) de la solution de l'agent antimicrobien à un tube fondu et refroidi de la gélose Columbia (17ml).
Serrer le bouchon du tube et retourner doucement plusieurs fois pour mélanger, en faisant attention de ne pas créer les bulles d'air. Verser le mélange dans les boites de Pétri et laisser refroidir (15-20mn).
- 3- D'autres boites de Pétri doivent être préparées en suivant la même procédure que l'étape 2 ci-dessus en remplaçant la solution de l'agent antimicrobien par de l'eau distillée stérile.
- 4- Après solidification de la gélose, sécher les boites en les plaçant avec les couvercles entrouverts dans une hôte à flux laminaire ou dans un incubateur pendant environ 30 mn.

4.9.3. Préparation de l'inoculum

- 1- Sélectionner des colonies de la gélose Columbia supplémentée avec du sang. La boite ne doit pas rester dans une atmosphère aérobie pendant plus de 30 mn avant de prendre la suspension.
- 2- Prélever à l'aide d'une pipette Pasteur cinq ou plus des colonies bien isolées, de morphologie similaire et les suspendre directement dans le bouillon «medium A» pour obtenir une turbidité équivalente à une densité de 0.5 Mc Farland.
- 3- 0.2 ml de la suspension bactérienne estensemencée à la surface de la gélose. Ensuite, les boites de Pétri sont incubées à 37°C pendant 5 jours.

10. Etude statistique

Toutes les données ont été saisies sur une base informatique classique (Excel 2010). La vérification et le traitement statistique des données sont effectués sur Excel, XLSTAT version 7.5.2 Copyright © Addinsoft, 1995 – 2004.

L'analyse descriptive des résultats des valeurs du diamètre de la zone d'inhibition en fonction de la concentration en polyphénols totaux, est représentée par la moyenne \pm écart type. Ces analyses ont été effectuées pour les deux souches *P. gingivalis* et *P. intermedia* et pour les quatre plantes : *A. herba alba*, *O. ficus indica*, *C. sinensis* et *P. crinita*.

Des graphiques sont aussi utilisés pour présenter les résultats obtenus. D'autres représentations graphiques comme les courbes de régressions ont été utilisées dans le but d'apprécier la qualité de la relation entre les diamètres de la zone d'inhibition et la concentration en polyphénols.

Avant d'appliquer les tests de comparaison, nous avons vérifié la normalité de nos échantillons. Et comme certains de ces derniers ne vérifient pas l'hypothèse de normalité, nous avons utilisé deux types de tests pour la comparaison entre les différents groupes, des tests paramétriques et des tests non paramétrique au seuil de signification $p < 0.05$.

En effet, les tests effectués sont :

- Le test de Shapiro-Wilk pour vérifier la normalité ;
- Le modèle d'analyse de la variance (ANOVA) dans le cas des données paramétriques pour comparer les moyennes observées selon la concentration en PPT et pour vérifier la signification des régressions obtenues ;
- Le test de Tukey pour les comparaisons multiples ;
- Les tests non paramétriques comme le test de corrélation de Spearman pour vérifier les régressions, le test de Kruskal-Wallis et le test de Friedman pour les comparaisons multiples ;
- le test de Kruskal-Wallis est un test non paramétrique à utiliser lorsqu'ils se présentent de k échantillons indépendants, afin de déterminer si les échantillons proviennent d'une même population ou si au moins un échantillon provient d'une population différente des autres. Ce test est souvent utilisé comme une alternative à l'ANOVA dans le cas où l'hypothèse de normalité n'est pas acceptable. Il permet de tester si k échantillons ($k > 2$) proviennent de la même population, ou de populations ayant des caractéristiques identiques, au sens d'un paramètre de position (le paramètre de

position est conceptuellement proche de la médiane, mais le test de Kruskal-Wallis prend en compte plus d'information que la position au seul sens de la médiane).

Chapitre 5

RÉSULTATS ET DISCUSSION

5.1. Analyses physicochimiques des plantes étudiées

Les analyses physicochimiques, des différentes plantes fraîches étudiées, *Opuntia ficus indica*, *Phlomis crinita*, *Artemisia herba-alba* et *Camellia sinensis*, réalisées dans le cadre de ce travail sont basées sur la détermination du taux d'humidité, du taux de la matière sèche, de leur teneur en minéraux ainsi que de l'identification par spectroscopie infrarouge. Les résultats sont rassemblés dans le tableau n° 12 et les figures n° 21, 22, 23 et 24.

Tableau n° 12 : Caractérisation physico-chimique des différentes plantes étudiées

	<i>Opuntia ficus indica</i>	<i>Phlomis crinita</i>	<i>Artemisia herba-alba</i>	<i>Camellia sinensis</i>
Taux d'humidité (%)	87.14	80	45.54	3.77
Matière minérale (%)	1.66	13.51	1.35	5.71
Matière organique (%)	98.34	86.49	98.65	94.29
Matière sèche (%)	12.86	20	54.45	96.23
pH	4.64	5.88	6.49	5.61

Les résultats des analyses physico-chimiques (tableau n° 12) nous ont permis d'affirmer la richesse en eau de la plante grasse *O. ficus indica* marquée par un taux d'humidité important compris entre 80 et 91%. De même, pour la plante *Phlomis crinita* avec un taux d'humidité de 80%. Ces résultats corroborent avec ceux d'**Arba, 2009**, qui a trouvé pour le cactus (*Opuntia ficus indica*) une valeur de 88.76%.

Quant à la plante *A. herba alba*, celle-ci présente un taux d'humidité relativement bas qui est de 45.54%.

Ces résultats diffèrent avec ceux, d'**Eloukili, 2013**, qui a montré qu'*A. herba-alba* récoltée dans la zone pastorale d'El Aricha présente un taux d'humidité de 12,5%, un taux de minéraux de 3,1% et une teneur en matière sèche de 87,5%.

Ces variations des différents taux peuvent être dues à des facteurs comme l'environnement, la période saisonnière de développement de la plante, la région de la cueillette, aux différences de la période saisonnière, de leur habitat de reproduction et de l'environnement de la plante (**Belhattab et al., 2012**).

Egalement, on constate que le taux des cendres varie d'un échantillon à l'autre. En effet, on peut remarquer que la plante *P. crinita* a le taux de cendre le plus élevé qui est de 13.51%,

alors que les plantes *O. ficus indica* et *A. herba-alba* ont des taux de 1.66% et 1.35%, respectivement. En 2013, **Eloukili**, a trouvé un taux de 3.4% pour *Artemisia*.

En outre, **Hadj Sadok en 2010**, rapporte une valeur d'humidité de 94.39%, un taux de matière sèche de 5.61% et 23.87% de la matière minérale pour la plante *O. ficus indica*. Ces différences des caractéristiques physicochimiques seraient probablement dues à plusieurs facteurs tels que l'environnement de chaque plante, le climat et la période saisonnière de récolte et même le stade de croissance de la plante (**Hadj Sadok, 2010 ; , Belhattab et al., 2012**).

Selon le même auteur, la faible teneur en matière sèche pourrait s'expliquer d'une part par la formation au cours du stade de croissance de la plante, d'un mucilage qui retient l'eau dans les tissus et d'autre part, par la formation d'une cuticule épaisse qui limite l'évaporation de l'eau.

Quant au pH, les résultats révèlent des valeurs légèrement acides avec des variations d'une plante à l'autre. En effet, la plante *O. ficus indica* présente une valeur de pH 4.64, 5.88 pour *P. crinita* et 6.49 pour *A. herba-alba*. En 2014 **Brahimi et al**, ont trouvé une valeur de pH de 5.02 pour *A. herba-alba* et la valeur de 5.5 est trouvée par **Kadam et al., 2011** pour *O. ficus-indica*.

Enfin, les résultats du tableau ci-dessus dévoilent une teneur en matière sèche de 96.22% et un taux d'humidité de 3.77% pour la plante *Camellia sinensis*. Le thé vert présente une teneur élevée en matière organique (94%) et une teneur faible en matière minérale (5%). En effet, la teneur en MS peut être expliquée par le stade de développement des plantes lors de la collecte. Egalement, le taux d'humidité des plantes est lié au climat et leur habitat.

Quant au pH, le thé vert présente un pH acide de 5.61. Ces résultats sont en accord avec l'étude menée par **Mossion, 2007** et **Rusak et al., 2010**. Cette acidité serait due à la présence de composés organiques, notamment les catéchines contenues dans les feuilles de thé qui se comportent comme des acides faibles plus ou moins dissociés (**Rusak et al., 2010**).

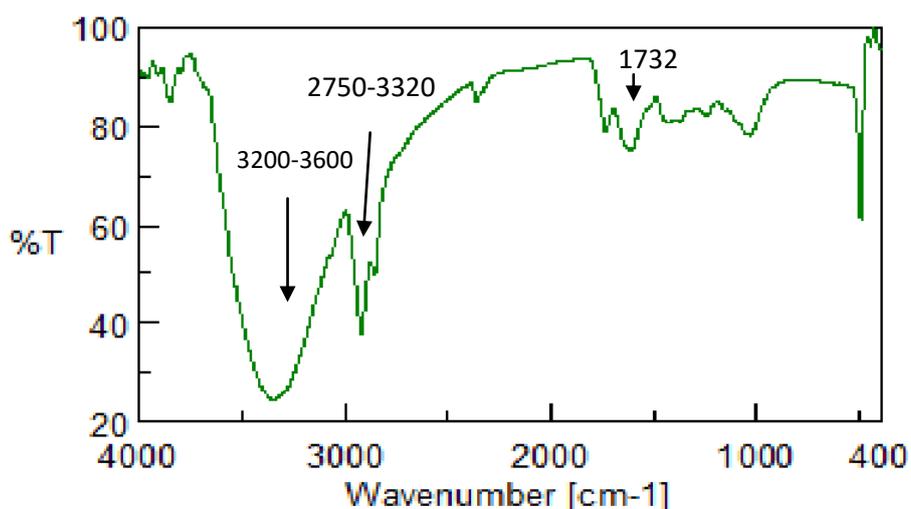


Figure n° 21: Spectre infrarouge de la plante *Artemisia herba-alba* avant hydrodistillation

Le spectre infrarouge de la plante *Artemisia herba-alba* (fig. n° 21) montre une forte bande d'absorption entre 3200 et 3600 indiquant la présence de groupement OH. La présence de liaison hydrogène se traduit par une large bande d'absorption centrée vers 3300 cm⁻¹. Une bande étroite peu intense caractérise la présence de groupement C-H entre 2750 et 3320 cm⁻¹ et une bande moyenne caractérise la présence de liaison C=O vers 1600 cm⁻¹, une autre bande vers 1732,41 cm⁻¹ correspondant à des liaisons C=O. La vibration d'élongation de liaison C-N est observée entre 1000 et 1350cm⁻¹ (Bertrand et Dufour, 2006).

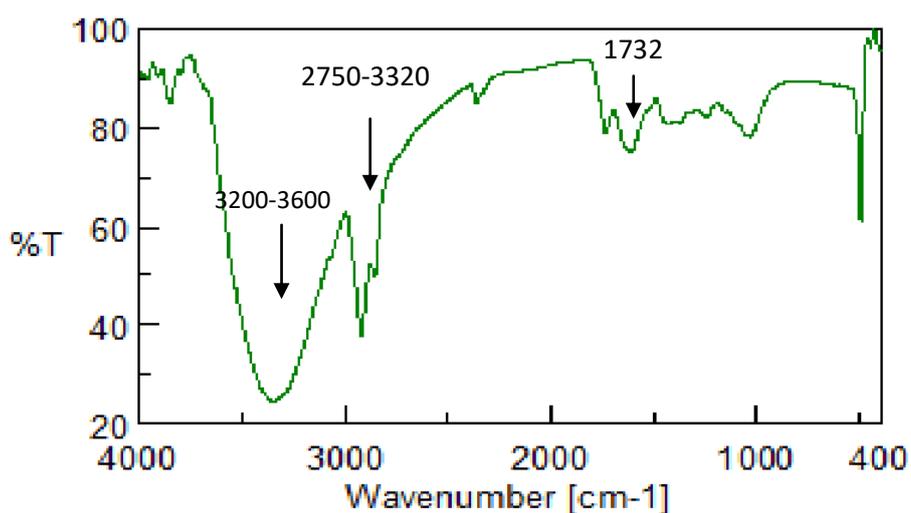


Figure n° 22 : Spectre infrarouge de la plante *Artemisia herba-alba* après hydrodistillation

Le spectre IR de la plante fraîche après hydrodistillation (fig. n° 22) est semblable à celui obtenu avant hydrodistillation. La différence est notée au niveau de leur intensité. De même,

les travaux de **Fernandez et Chemat, 2012** ont confirmé que le matériel végétal soumis à l'hydrodistillation (3heures) semble similaire au matériel non traité. Cependant, les observations au microscope à balayage ont montré une destruction partielle des glandes, mais une partie d'entre elles demeurent encore remplies (**Fernandez et Chemat, 2012**).

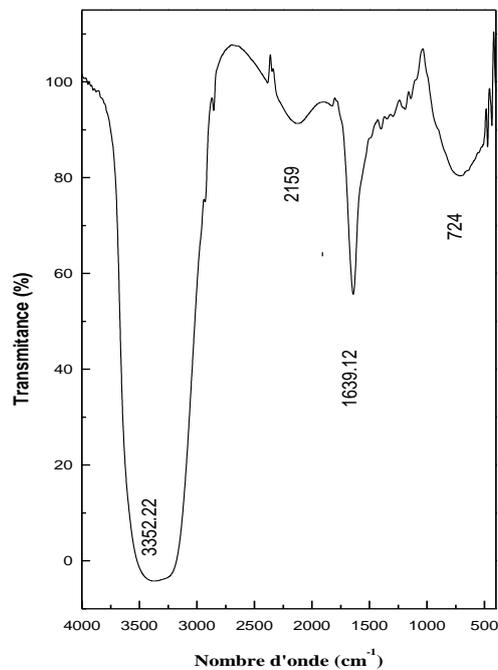


Figure n° 23 : Spectre infrarouge de la plante *Opuntia ficus indica*

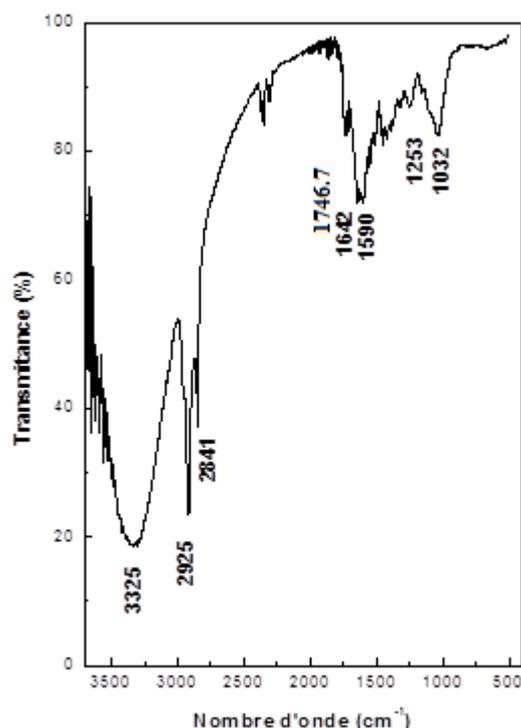


Figure n° 24 : Spectre infrarouge de la plante *Phlomis crinita*

La figure du spectre IR d'*O. Ficus indica* (fig. n° 24) illustre une forte et large bande à 3352.22 cm^{-1} qui indique la présence de la liaison OH et une autre bande moyenne, fine à 1639.12 cm^{-1} . Cette dernière représente la liaison C=C.

Quant à la plante *P. crinita*, son spectre montre la présence d'une bande large et forte à 3325.14 cm^{-1} indiquant la présence de liaison OH et une bande étroite à 2925.64 cm^{-1} caractérisant la présence de la liaison C-H et un autre pic de 1746.7 cm^{-1} représentant la liaison C=O. Une autre bande à 1642.88 représente la liaison C=C et la liaison C-N est donnée par les deux pics à 1253 et 1032.72 cm^{-1} (**Bertrand et Dufour, 2006**).

Les résultats de la spectroscopie infrarouge de la plante *C. sinensis* sont illustrés dans la figure ci-dessus (fig. n° 25): cette figure montre que la poudre de thé vert présente une large zone d'absorption entre 3500 et 500 cm^{-1} qui correspond aux vibrations suivantes: Une bande d'absorption à $3328,90\text{ cm}^{-1}$ détermine la présence des composés phénoliques ou alcools (O-H). Une bande à $2910,59\text{ cm}^{-1}$ et une bande à $2833,86\text{ cm}^{-1}$ montrent la présence des liaisons C-H. Une bande d'absorption à 1733.92 indique la présence des liaisons C=O et une autre bande à 1636.11 cm^{-1} caractérise la présence de liaison C=C (**Bertrand et Dufour, 2006**).

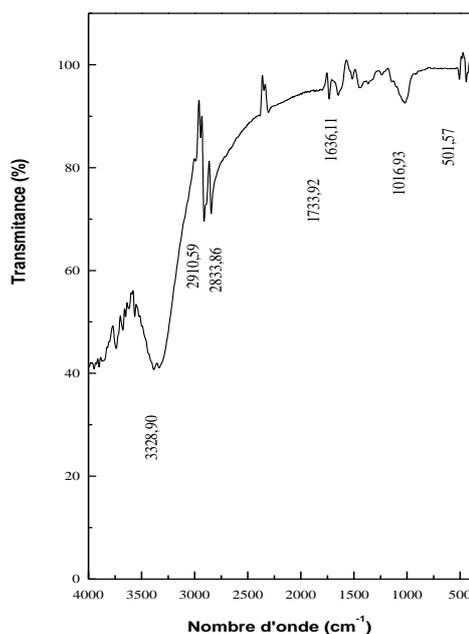


Figure n° 25 : Spectre infrarouge de la plante *Camellia sinensis*

5.2. Caractérisation des huiles essentielles d'*A. herba-alba*

5.2.1. Caractères organoleptiques de l'huile d'*Artemisia herba-alba*

L'étude de caractères organoleptiques de l'huile est fondée sur son aspect, sa couleur et son odeur. Les résultats sont illustrés sur le tableau suivant:

Tableau n° 13 : Caractères organoleptiques de l'HE d'*Artemisia herba-alba*

Aspect	Liquide
Couleur	Jaune pâle
Odeur	Forte

On constate d'après le tableau n° 13 que l'huile essentielle d'*Artemisia herba-alba* a un aspect liquide, une couleur jaune avec une odeur forte, semblable à l'odeur originelle de l'armoise blanche. D'après **Fernandez et Chemat, 2012**, la couleur des huiles essentielles est due à la présence de certains composants comme les pinènes (α et β), le myrcène et le limonène.

Ces résultats corroborent avec ceux obtenus par **Bouzidi, 2016** qui a extrait les HE d'*A. herba-alba* récoltée dans la région de Saida à l'interface Tell- steppe.

5.2.2. Détermination du rendement de l'huile essentielle obtenue

Dans ce travail nous avons calculé le rendement en huiles essentielles obtenues par hydrodistillation. Selon les conditions opératoires, le meilleur rendement obtenu est de 0,84 ±0,0%. Cette valeur est un peu faible par rapport à celle obtenue par **Bouzi**, 2016 qui a obtenu un rendement maximal de l'HE d'armoise blanche de 0.932 %. Des rendements variables sont obtenus à partir des échantillons d'armoise blanche de différentes régions en Algérie (de 0.2% à 0.95%) (**Bezza et al., 2010 ; Belhattab et al., 2012**). Quelques différences dans les valeurs de rendement sont observées pour l'huile essentielle d'armoise blanche d'Espagne (0,41% à 2,30%) (**Salido et al., 2004**).

En effet, le rendement d'extraction d'huile essentielle de l'armoise blanche est variable suivant l'origine géographique de la plante; en Tunisie (0.68% à 1.93%) et en Jordanie (1.3%) (**Bouzi**, 2016).

Le rendement et la qualité des huiles essentielles des espèces du genre *Artemisia* sont influencées par le pH des sols (**Bouzi**, 2016).

Nous remarquons aussi d'après les figures n° 26 et 27 que le rendement dépend également de la quantité du végétal utilisé et de l'humidité. En effet, ces résultats montrent que le séchage de la plante affecte la quantité et la qualité de l'HE extraite. Aussi, nous suggérons de ne pas sécher la plante avant de réaliser l'extraction des huiles essentielles.

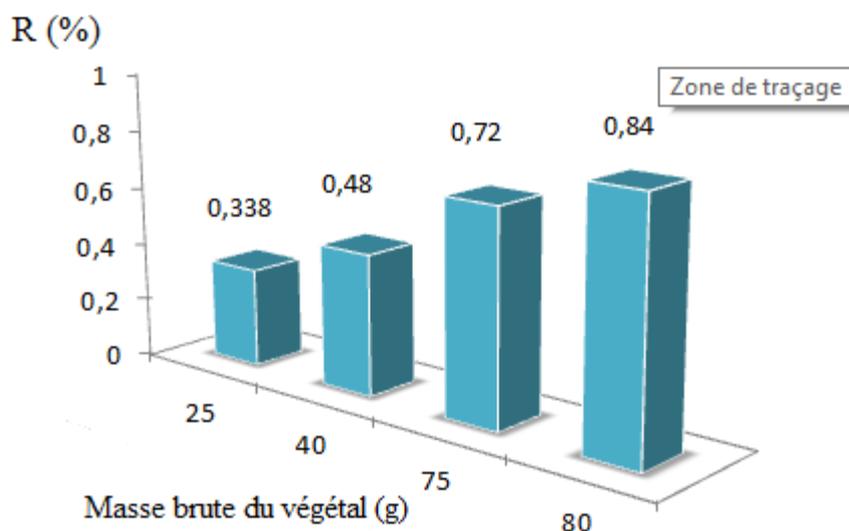


Figure n° 26: Variation du rendement des HE en fonction de la masse brute du végétal

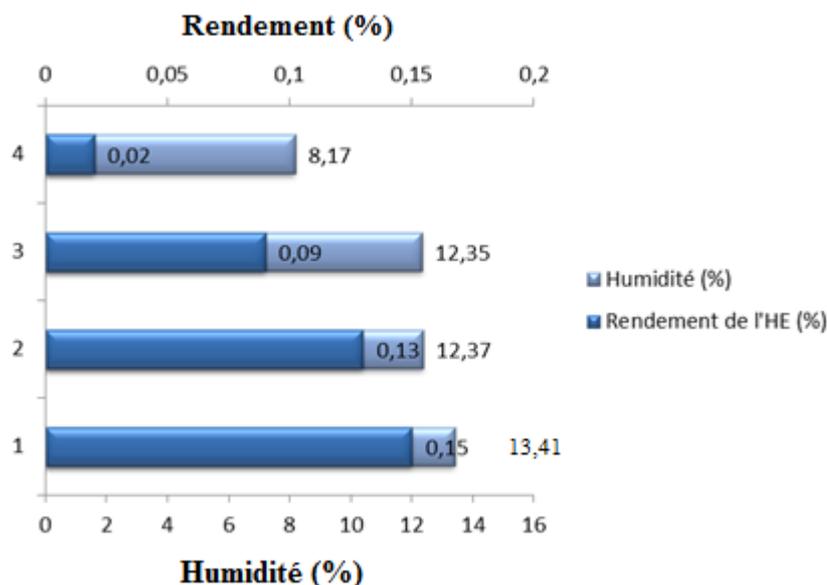


Figure n° 27: Variation du rendement de l'HE en fonction de l'humidité de la plante

5.2.3. Propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle d'*A. herba- alba*

Les paramètres physico-chimiques sont des caractères essentiels pour contrôler la qualité des huiles essentielles. Ces paramètres sont: l'indice de réfraction, l'indice d'acide, l'indice d'ester, le pH et le point de congélation. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau n° 14.

Tableau n° 14 : Les propriétés physico-chimiques de l'HE d'*Artemisia herba-alba*

Indice de réfraction	1.4443±0,0015
Densité relative	0.9700 ±0,0000
Indice d'acide	0,5611±0,0000
Indice d'ester	9.6610±0,6600
pH	5,6
Point de congélation	-20

D'après les résultats du tableau ci-dessus, on remarque que l'HE d'*A. herba- alba* a un indice de réfraction de $1.4443 \pm 0,0015$ à une température de $20,9^\circ\text{C} \pm 0,06$, une densité de 0.97, un indice d'acide et d'ester de $0.5611 \pm 0,0$ et $9.66 \pm 0,66$, respectivement. Aussi, cette huile présente un pH acide de 5.6 et un point de congélation de -20.

Il est clair que, l'indice de réfraction varie selon la composition chimique. Cette dernière dépend de la longueur des chaînes d'acides et essentiellement de la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé (**Boukhatem et al., 2010**). L'indice de réfraction permet de distinguer une variété d'huile et son degré de pureté.

La valeur de l'indice de réfraction obtenu par **Bouzidi, 2016** est de 1.4811. Cet auteur explique la variation de cet indice par la nature de la composition de l'huile essentielle. En effet, l'indice de réfraction varie selon la composition chimique, la masse volumique et augmente avec l'instauration ou la présence de fonctions secondaires.

L'indice d'acide donne une idée sur le taux d'acides libres. Une valeur inférieure à 2 est une preuve de bonne conservation de l'essence (faible quantité d'acides libres). Inversement, si la valeur de l'indice d'acide est élevée, cela signifie une dégradation de l'HE durant sa conservation (**Boukhatem et al., 2011**). De même, l'indice d'ester est lié à la présence de composés à fonction ester.

Quant au pH, sa valeur est légèrement acide ce qui permet de neutraliser les microorganismes.

Ces résultats corroborent avec ceux obtenus par **Abaas et al., 2013** qui ont obtenu une valeur d'indice de réfraction de 1.48 pour l'HE d'*A. herba-alba*. Par contre, les valeurs de l'indice d'acide et l'indice d'ester sont différents et qui sont de 6.21 et 11.43, respectivement.

Cette fluctuation due à la composition chimique de l'HE extraite et qui dépend d'un grand nombre de paramètres, à savoir : La période saisonnière de la récolte, l'origine botanique ainsi que la méthode d'extraction utilisée.

5.2.4. Analyse infrarouge de l'huile essentielle d'*A. herba-alba*

Le spectre IR de l'huile essentielle d'*A. herba-alba* a montré (figure n° 28) la présence d'une faible bande d'absorption arrondie à 3400 cm^{-1} indiquant la présence de groupements fonctionnels OH, un pic intense à 2900 cm^{-1} qui représente les liaisons des chaînes aliphatiques C-H, et enfin, un pic moyen à 1764 cm^{-1} caractérisant la présence de liaison C=O.

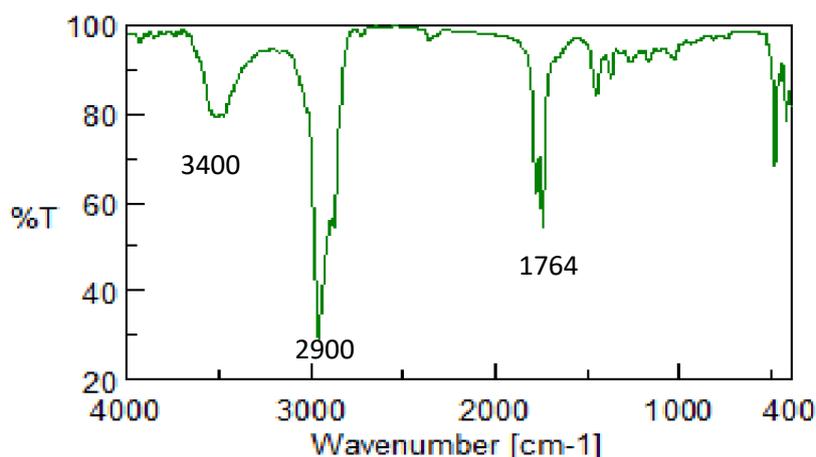


Figure n° 28 : Spectre infrarouge de l'huile essentielle d'*Artemisia herba-alba*

La détermination de ces paramètres physico-chimiques (densité, indice d'ester, de réfraction...) est une étape importante mais non suffisante pour caractériser les huiles essentielles. Il est donc nécessaire de la compléter par des analyses chromatographiques CG/SM, qui sont utilisés comme moyens analytiques nécessaires pour l'identification des substances volatiles.

5.2.5. Analyse de la composition chimique de l'HE de la plante *A. herba-alba* par GC/MS

L'analyse de l'huile essentielle (HE) de la plante *Artemisia herba-alba* issues des deux régions de Biskra et de Bousaada a été effectuée par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) en vue de déterminer la composition chimique de l'HE. Les résultats obtenus sont représentés ci-dessous: (Figures n° 29 et 30. Tableau n° 15).

De l'analyse du tableau n° 15, il en ressort une large prédominance de 17 composés principaux qui apparaissent en gras (voir tableau). En effet, cette étude a permis d'identifier 55 composés (pour la collecte du mois de Mai) dont les plus importants sont: Camphre (21.58%), thujone (12.96%), Eucalyptol (9.30%), 1,6-Dimethylhepta-1,3,5-triene (9.07%), 1,2,5,5-tetra methyl- (5.28%), β -thujone (4.32%), 1,2-Pentadiene (3.53 %), camphene (3.44%), Limonene oxide, cis- (3.16%), borneol (1.71%), (1,3-Dimethyl-2-méthylène-cyclopentyl)-méthanol (1.30%), (-)-terpinen-4-ol (1.55%), alpha-Pinene (1.41%), m-cymene (1.37%), beta-myrcene (1.24%), (E)p-2-menthen-1-ol (1.10%) et 1 H-Pyrrole-2- carboxylic acid (1.08%) avec un total de tous les composants identifiés de 99.23%. Les résultats montrent que cette HE est caractérisée par une forte teneur en molécules de la famille des monoterpènes oxygénés comme le camphre et d'autres monoterpènes d'un pourcentage

relativement important comme le thujone et l'eucalyptol. Ces résultats sont en accord avec les travaux d'analyse de la composition chimique de 4 types d'HE, provenant de 4 régions différentes d'Algérie (Benifouda, Bougaa, Boussaada et Boutaleb), dont l'analyse confirme la dominance du camphre avec des pourcentages qui varient entre 17 et 34%, d' α -thujone (6-29%) et d'Eucalyptol (8-10%) (**R. Belhatab et al., 2014**). En 2010 **Dahmani-Hamzaoui et Baaliouamer** ont également mis en évidence la dominance du camphre (49%) dans les HE du nord du Sahara Algérien (**Zaim et al., 2012**).

L'analyse chimique de l'HE de l'armoise blanche de l'Algérie, de l'Égypte, du Maroc et d'Espagne, a permis de mettre en évidence une richesse singulière en camphre avec un pourcentage qui se situe entre 15 et 68% (**Feuerstein I., et al., 1988 ; Fleisher Z., et al., 2002 ; Vernin G. et al., 1995 ; Ghanmi et al., 2010 ; Sabayou et al., 2014**).

Les travaux de **Zaim et al., 2012** ont montré que l'HE d'*A. herba-alba* de Maroc (région de Rabat) est riche en camphre (26.67%) et en α -thujone (9.26%) (**R. Belhatab et al., 2014**), avec la dominance du chrysanthénone (28,10%), on note l'absence de ce monoterpène oxygéné dans notre HE. Ce composé pourrait provenir de l'hydrolyse puis de l'oxydation de l'acétate de cis-chrysanthényle (**Bezza et al., 2010**). D'autres travaux, rapportent la dominance du camphre (>50%) dans 18 échantillons de la régions de Sousse (**Zaim et al., 2012**). Le camphre et l' α -thujone (30% et 40% respectivement) sont décrits comme constituants majoritaires dans 18 spécimens d'HE de Marrakech (**Zaim et al., 2012**).

Au regard des différents travaux publiés, on note une chimio-variabilité de l'HE chez l'espèce *A. herba-alba*. En effet, deux chémotypes différents ont été répertoriés en Israël et en Égypte (**Bezza et al., 2010, Feuerstein I., et al., 1986**). Au Maroc, 16 chémotypes ont été recensés avec en majorité des monoterpènes (**Bezza et al., 2010 ; Lamiri A., et al., 1997**). En Tunisie (**Bezza et al., 2010 ; Haouari M. et Ferchichi A., 2009**), dix composés, avec une teneur supérieure à 10 %, ont été relevés. Les principaux composants sont l'eucalyptol, les thujones, la chrysanthénone, le camphre, le bornéol, l'acétate de chrysanthényle, l'acétate de sabinyle, la davanone et les éthers dérivés de la davanone. Dans la composition de l'HE d'*Artemisia herba-alba* provenant d'Algérie, on note essentiellement la présence de camphre, de l' α - et de β -thujones, d'eucalyptol et de dérivés chrysanthényles (**Bezza et al., 2010 ; Dob T., et Benabelkader T., 2006 ; Vernin G., et al., 1995**).

Cette variabilité du profil chimique des HE existant au sein de l'espèce *A. herba-alba* peut être due à des facteurs exogènes comme l'ensoleillement, la nature et les composants du sol, la température, l'altitude, etc. et aux facteurs endogènes tel que le patrimoine génétique des individus. Ces facteurs constituent autant de paramètres qui influencent à la fois le rendement et la qualité chimique de l'huile essentielle (**Bencheqroun et al., 2012**). On note également l'influence de la technique d'extraction sur la composition chimique de l'huile essentielle (**Bencheqroun et al., 2012**).

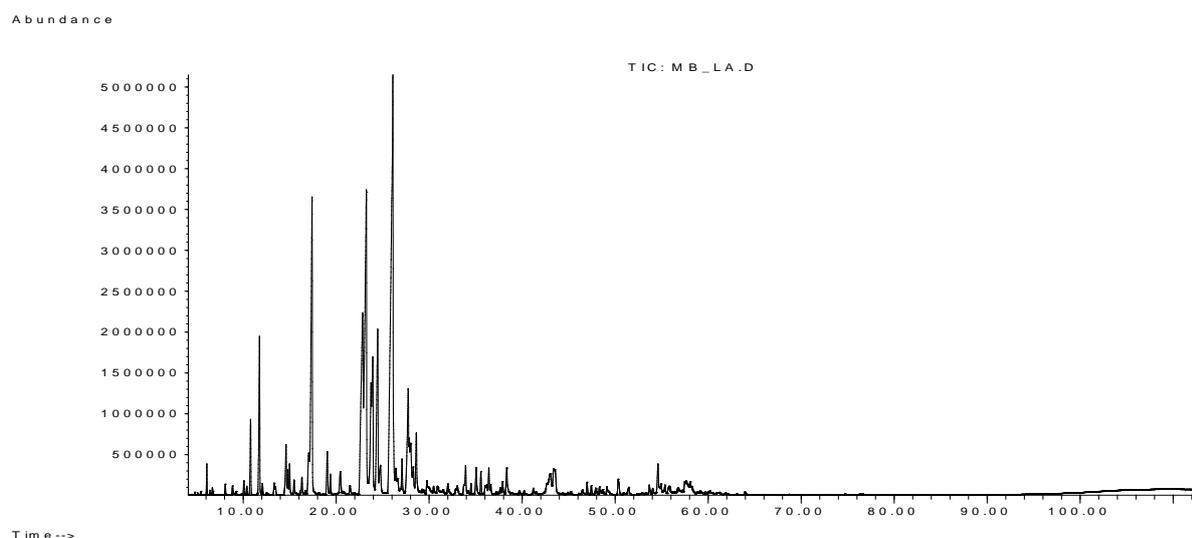


Figure n° 29 : Spectre GC-MS de l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* de la région de Biskra

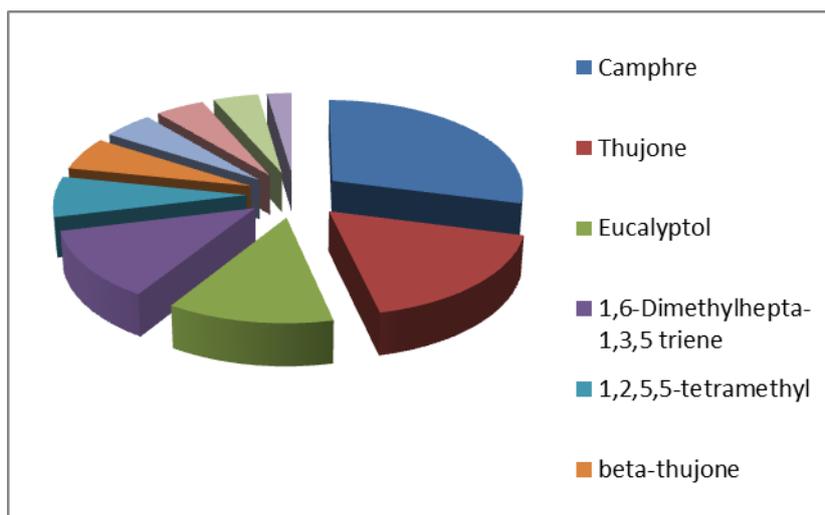


Figure n° 30 : Variation des composants majeurs retrouvés dans l'huile essentielle d'*Artemisia herba-alba* de la région de Biskra

Tableau n° 15 : Composition de l'HE d'*Artemisia herba-alba* de la région de Biskra

N°	Composants	RT	Pourcentage	Qualité
1	1,3-Cyclopentadiene, 1,2,5,5-tetra ethyl-	6.10	0.41	86
2	Limonène	8.08	0.17	91
3	1,3-Pentadiene	8.86	0.17	72
4	Carene	10.08	0.25	94
5	3-Thujene	10.39	0.16	94
6	alpha.-Pinene	10.80	1.41	96
7	Camphene	11.75	3.44	97
8	Benzene, butyl-	12.08	0.21	64
9	cis-sabinene	13.33	0.14	91
10	beta.-Myrcene	14.61	1.24	94
11	1,6-Dimethylhepta-1,3,5-triene	14.80	0.50	94
12	Benzene, 1,2,3-trimethyl-	14.99	0.65	97
13	alpha.-Phellandrene	15.47	0.30	91
14	(+)-4-Carene	16.32	0.35	97
15	m-Cymene	17.06	1.37	93
16	Eucalyptol	17.41	9.30	99
17	1H-Pyrrole-2-carboxylic acid	19.05	1.08	53
18	γ -Terpinene	19.39	0.44	97
19	Bicyclo[3.1.1.] heptan –endo-6-ol, syn-7-bromo-	20.45	0.68	59
20	α -Terpinolene	21.48	0.23	86
21	1,6-Dimethylhepta-1,3,5-triene	22.85	9.07	56
22	Thujone	23.25	12.96	94
23	Limonene oxide, cis-	23.75	3.16	35

24	β -Thujone	23.95	4.32	93
25	1,3-Cyclopentadiene, 1,2,5,5-tetra methyl-	24.47	5.28	94
26	(E)-p-2-Menthen-1-ol	24.75	1.10	95
27	Camphre	26.10	21.58	96
28	2H-Pyran, tetrahydro-2-(12-pentade cynyloxy)-	26.43	0.80	50
29	1,3-Cycloheptadiene	26.63	0.27	46
30	2(10)-Pinen-3-one, (.+/-.)-	27.08	0.64	53
31	1,2-Pentadiene	27.75	3.53	49
32	Santolina epoxide	27.817	0.98	50
33	Borneol	28.02	1.71	91
34	1,3-Cyclopentadiene	28.29	0.73	55
35	(-)-Terpinen-4-ol	28.62	1.55	95
36	alpha-Terpineol	29.76	0.16	72
37	2,6-Dimethyl-3,5,7-octatriene-2-ol, Z,Z-	32.02	0.33	41
38	Benzene, 1-ethyl-2,3-dimethyl-	33.93	0.88	46
39	Limonene oxide,trans-	34.250	0.21	32
40	2-Cyclohexen-1-one, 3-methyl-	35.06	0.78	52
41	Bornyl acetate	35.56	0.46	98
42	2-Methyl-5-(fur-3-yl)-pent-1-en-3- Ol	36.05	0.21	47
43	2-Undecanone	36.41	0.44	94
44	1,3-Cyclopentadiene, 5-(1,1-dimethyethyl)-	37.90	0.31	60
45	1.3-Cyclopentadiene, 5,5-dimethyl-2-ethyl-	38.34	0.80	91
46	1(2H)-Naphthalenone, octahydro-4-hydroxy-, trans-	42.65	0.38	43
47	(1,3-Dimethyl-2-methylene-cyclopentyl)-methanol	43.08	1.30	43
48	5-Isopropenyl-2-methylcyclopent-1-enecarboxaldehyde	43.39	0.89	70
49	Spiro [5.5] undec-1-ene	43.52	0.70	76
50	1(2H) Naphthalenone	46.98	0.26	50/38
51	4,5-Nonadiene	47.44	0.19	30
52	Davana ether	50.33	0.51	94
53	(-)-Spathulenol	54.60	0.70	83
54	(Z,Z)-.alpha.-Farnesene	57.48	0.15	59
55	4-Chlorobezenesulfonamide, N-mthyl-	57.63	0.16	95

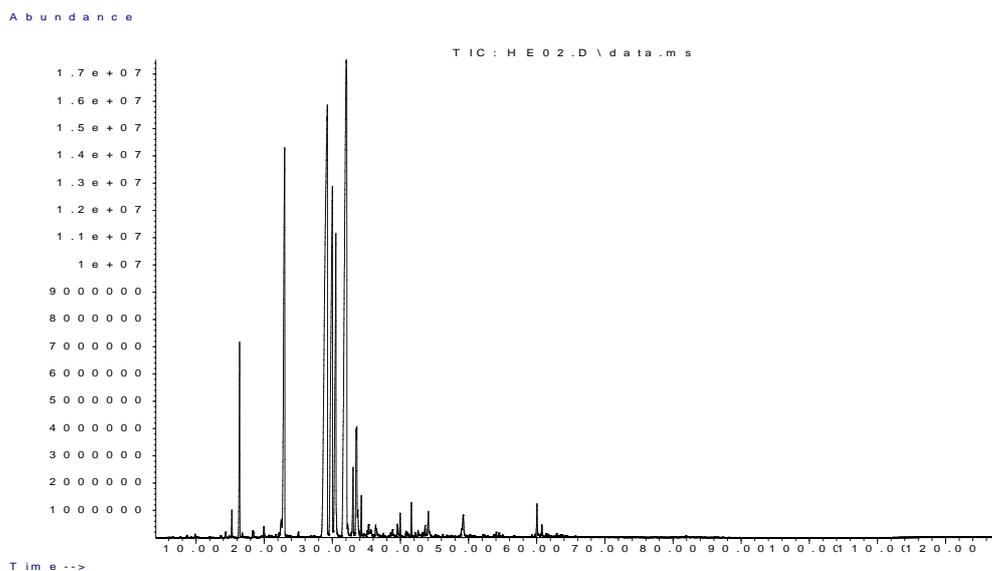


Figure n° 31 : Spectre GC-MS de l'huile essentielle d'*Artemisia herba-alba* de la région de Bousaada

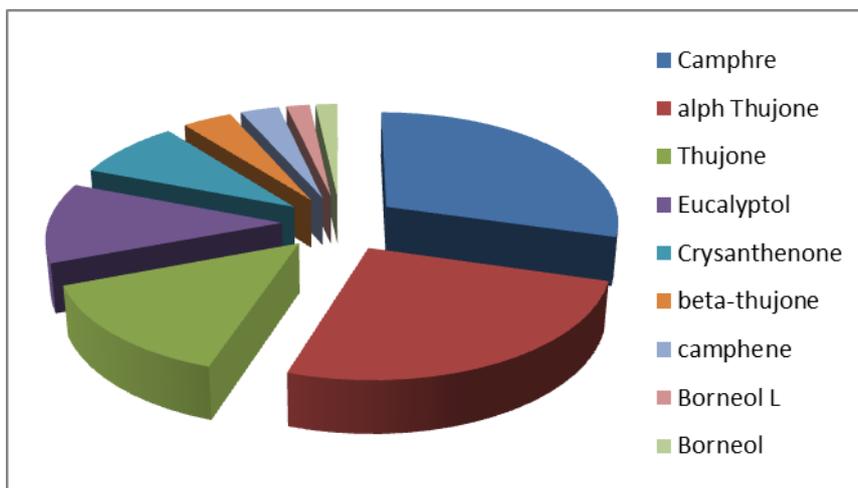


Figure n° 32 : Variation des composants majeurs retrouvés dans l'huile essentielle d'*Artemisia herba-alba* de la région de Bousaada

Tableau n°16 : Composition de l'HE d'*Artemisia herba-alba* de la région de Bousaada

N°	Composants	RT	Pourcentage	Qualité
1	1.3- Cyclopentadiene, 5-(1,1-dimeth	8.64	0.03	91
2	Cis- Salvene	9.86	0.04	98
3	4-Pental, 2-methyl-	10.00	0.02	43
4	Santolina triene	13.59	0.02	93
5	Tricyclene	14.32	0.08	96
6	.alpha.-thujene	14.84	0.02	91
7	.alpha.pinene	15.25	0.35	96
8	Camphene	16.39	2.72	97
9	Verbenene	16.78	0.06	91
10	Sabinene	18.33	0.09	97
11	2-Beta.-Pinene	18.42	0.07	97
12	6-methyl-3 5-heptadien-2-one	19.66	0.04	38
13	Benzene, 1,2,4-trimethyl-	19.96	0.20	95
14	1-Phellandrene	20.72	0.04	95
15	2,5,5-trimethyl-3,6-heptadien-2-ol	21.00	0.04	74
16	Benzene, 1—methyl-2-(2-propenyl)-	21.45	0.01	95
17	Alpha.-Terpinene	21.69	0.05	97
18	Benzene, 1,2,4-trimethyl	22.19	0.09	97
19	Benzene, 1-methyl-2-(1-methylethyl)	22.53	0.54	97
20	1,8- Cineole	23.00	10.31	98
21	2,6-octadien-1-ol, 3,7-dimethyl-	23.27	0.04	52
22	E-. beta.-ociménol	23.58	0.03	59
23	2,3-hexadiene, 2-methyl-	23.72	0.04	50
24	.gamma.- Terpinene	25.01	0.08	97
25	2,4- Hexadiene	26.79	0.02	70
26	Alloocimene	27.24	0.03	91
27	.alpha.-thujone	29.21	22.67	97
28	beta.thujone	29.26	3.49	97
29	Thujone	30.01	12.57	94
30	Chrysanthenone	30.25	7.55	96
31	Camphor	32.04	26.11	97
32	1,3-cyclopentadiene, 1,2-dimethyl-	32.26	0.19	43
33	Cyclohexanol, 1-ethynyl-	32.79	0.06	62
34	Pinocarvone	33.04	1.08	86
35	1-tert-butyl-3,3-DimethylcycloproP	33.29	0.03	55
36	Borneol	33.50	1.54	83
37	Borneol L	33.60	1.64	97
38	Toluene d3	33.75	0.49	80
39	Terpinen-4-ol	34.25	0.65	98
40	.alpha.thujenal	34.60	0.04	72
41	2-furancarboxaldehyde	34.78	0.04	52
42	Benzenmethanol, 4-(1-methylethyl)	35.11	0.09	68
43	Myrtenal	35.34	0.26	96
44	Cis-piperitol	35.54	0.08	60
45	Myrtenol	35.67	0.16	96

46	8-methylene-3-oxatricyclo [5.2.0.0(2,4)] onane	36.14	0.04	27
47	Verbenone	36.36	0.19	98
48	Piperitol	36.50	0.15	94
49	Isobornyl acetate	37.50	0.07	87
50	Carveol 2	38.26	0.01	62
51	Cuminaldéhyde	38.57	0.08	98
52	Carvone	38.85	0.13	96
53	p-Menthone	39.03	0.02	52
54	Piperitone	39.55	0.31	97
55	Chrysanthenyl acetate	39.96	0.32	87
56	Isophorone	40.81	0.13	53
57	Carveol (fr.2)	41.09	0.09	55
58	Endobornyl acetate	41.60	0.49	98
59	Sabinyl acetate	42.17	0.06	86
60	Bicyclo[4.2.0] oct-1-ene, 7-exo-ethenyl-	42.59	0.13	43
61	Phenol, 2-(1,1-dimethylethyl)-	42.81	0.01	93
62	AcetylphenylcarBinol	42.91	0.05	68
63	1-phenylpropane-1,3-diol	43.26	0.11	42
64	Filifolide A	43.62	0.21	49
65	Phenol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)	43.84	0.02	93
66	1,3-cyclopentadiene, 5,5-dimethyl-	44.09	0.51	91
67	3,3-dimethyl-6-methylcyclohexEn	44.26	0.13	76
68	Apocamphane	45.16	0.03	87
69	(+)-trans-Chrysanthenyl acetate	46.20	0.04	80
70	Eugenol	46.81	0.05	97
71	Alpha.copaene	47.42	0.02	99
72	R(+)-Limonen	47.51	0.01	52
73	1,3-cyclohexadiene-1-carboxaldehyd	49.20	0.78	78
74	3,5-heptadienal 2-ethylidene-6-methyl-	50.01	0.01	55
75	2-isopropylidene-3-methylhexa-3,5-dienal	50.17	0.02	86
76	3-hexene, 3-methyl-, (z)	52.13	0.05	72
77	2-hexene 4-methyl- (e)-	52.22	0.03	50
78	Alloaromadendre-ne	52.74	0.02	97
79	tricyclo [4.3.1.13,8] undecane	53.71	0.06	58
80	Germacrene D	54.06	0.07	99
81	Inconnu	54.41	0.08	-
82	butanone 1-chloro-3,3-dimethyl-	54.64	0.02	38
83	Germacrene B	54.99	0.04	97
84	.delta.-Cadinene	56.65	0.03	96
85	(7s)-trans-bicyclo[4.3.0]-3-nonen-	58.35	0.01	49
86	Caryophyllene	59.27	0.04	50
87	Cyclohexane, (2-nitro-2-propenyl)-	59.75	0.05	45
88	(+) spathulenol	60.04	0.60	97
89	.beta.-selinene	60.34	0.05	74
90	.beta.-Copaen-4.alpha.-ol	60.54	0.06	53
91	(+)- (1R, 5R)-2(10)-Pinen-4-one	60.75	0.27	47
92	Caryophyllene oxide	61.35	0.08	70

93	AlloaromadendreNe	61.67	0.05	70
94	Bicyclo[3.1.0]hex-3-en-2-ol, 2-methyl-	62.08	0.02	38
95	.alpha.-Farnesene	62.56	0.02	42
96	3-octyne, 5-methyl-	62.93	0.08	60
97	trans-Geraniol	63.14	0.02	27
98	Junipene	63.53	0.06	64
99	1,5-heptadien-4-one, 1-(6-ethenyl-)	63.69	0.04	59
100	Myrcenol	64.10	0.04	38
101	Aromadendrene oxide-(2)	64.39	0.02	46
102	Pyrrolidine, 1-(1-cyclohexen-1-yl)	80.33	0.01	51
103	Inconnu	81.86	0.02	-
104	Mandelamide	82.17	0.01	38

Les analyses chromatographiques de l'HE essentielle extraite à partir de la plante *A. herba-alba* de la région de Boussaada par la méthode d'hydrodistillation détectent la présence de 104 éléments chimiques avec un taux totale de 99.97% parmi lesquels 10 éléments dominants qui sont : Camphre (26.11%), .alpha thujone (22.67%), thujone (12.57%), eucalyptol (10.31%) chrysanthenone (7.55%), beta thujone (3.49%), et d'autres composants avec des teneurs moins importantes comme le camphene (2.72%), borneol L (1.64%), borneol (1.54%) et pinocarvone (1.08%).

Les résultats obtenus sont identiques à ceux de **Belhattab et al.**, qui ont identifié la composition chimique de l'HE de la plante *d'A. herba-alba* de la région de Boussaada en **2014** obtenue par la méthode d'hydrodistillation et ont révélé la composition suivante : Camphre (17.3%), alpha thujone (27.7%), eucalyptol (9.8%), chrysanthenone (7.6%), beta thujone (3.4%) et la camphene (4.1%).

Les résultats de **Bouzidi, 2016** montrent que l'huile d'armoise blanche de la région de Saida à l'interface Tell- steppe est formée principalement du camphre (29.8 %), 1,3-Cyclopentadiene, 1,2,5,5-tetramethyl- (15.6 %), Chrysanthenone (8.2 %), Eucalyptol (6,5 %), Arthole (4,5 %). Ces composés sont accompagnés d'autres constituants minoritaires qui ne sont pas dénués d'importance avec des quantités relativement faibles comme le thujone (1,08% - 1, 40%), camphene (0.67%), eugenol (0.47%).

Ces résultats montrent que la région du développement de la plante est un facteur important qui influe la composition chimique des HE. Ainsi, en comparant cette composition avec celle de l'HE de la région de Biskra (tableau n° 17), nous remarquons une légère différence dans les quantités des éléments majeurs avec l'apparition d'autres composants comme le chrysanthénone.

La variabilité intra-spécifique existant au sein de l'espèce *A. herba-alba* peut être d'origine géographique et génétique.

Les constituants majeurs qui existent chez les deux types de plante sont le camphre, le thujone et l'eucalyptol (tableau n° 17). Ces molécules sont des substances naturelles de la classe des monoterpènes. Les monoterpènes oxygénés comme le camphre (21.58%), ont fait l'objet de nombreuses études en raison de leur activité antibactérienne et autres propriétés biologiques. En effet, le camphre composé hautement bioactif, est souvent utilisé en application à la peau pour son activité anti-prurigineuse, analgésique et cicatrisante (**Altunkaya Arzu et al., 2014**). Il est également utilisé comme décongestionnant nasal (**Altunkaya Arzu et al., 2014**).

L'eucalyptol ou 1.8-cinéole, est un monoterpène appartenant à la classe des éthers. Il a des propriétés antibactériennes, antispasmodiques et antitussives. Son taux dans notre huile essentielle d'*A. herba-alba* est de 9.30%. Ce taux varie suivant les régions de la cueillette (**Bouaoun et al., 2007**).

Quant à la thujone (12.96%), ce monoterpène cétonique largement distribué dans les plantes aromatiques médicinales, possède plusieurs propriétés, notamment une forte activité antimicrobienne (**Biljana Nikolic et al., 2011 ; Cermelli et al., 2008; Lee et al., 2011; Mahbourbi and Farzin, 2009; Mitic-Culafic et al., 2005; Sokovic et al., 2010**).

Cependant, même si l'effet neurotoxique de la thujone chez les mammifères est bien établie; les données rapportées indiquent que les huiles essentielles contenant de la thujone, peuvent être utilisées à des fins médicales (**Biljana Nikolic et al., 2011 ; Mayer et al, 2009;. Mueller et al, 2010; Naser et al., 2005; Presti et al, 2007**). Notons également, la présence de molécules minoritaires comme le limonène (0.17%) et le carène (0.25%), etc.

Tableau n° 17 : Comparaison entre la composition des huiles essentielles des deux régions Biskra et Bousaada

Composants	HE de Biskra	HE de Bousaada
Camphre	21,58%	26,11%
Thujone	12,96%	12,57%
Alpha thujone	0%	22,67%
Eucalyptol	9,30%	10,31%
Beta thujone	4,32%	3,49%
Camphene	3,44%	2,72%
Borneol	1,71%	1,54%
Terpinen-4-ol	1,55%	0,65%
Limonene oxide, cis	3,16%	0%
Chrysanthenone	0%	7,55%

5.3. Identification des souches

Quarante prélèvements ont été effectués à partir de différents patients atteints de la maladie parodontale. Ces patients représentent une tranche d'âge allant de 12 ans à 55 ans de sexe différent. Nous avons pu prélever, isolé et identifié à partir de ces patients les deux bactéries *P. gingivalis* et *P. intermedia* considérés comme les agents causaux majeurs dans l'initiation et la progression de la maladie parodontale (**Gianmaria F. Ferrazzano et al., 2011 ; K. Nagano et al., 2015**).

Après l'ensemencement de la culture prélevée, nous avons obtenu suite à l'incubation de 5 jours, le développement d'une culture mixte qui contient toutes les souches qui colonisent la poche parodontale avec l'apparition des colonies pigmentées en noir. Lesquelles représentent les bactéries recherchées dans notre étude.

Le nombre de bactéries pigmentées représente un facteur important dans l'initiation et le développement de la maladie parodontale. En effet, la santé gingivale est associée à la présence d'une faible masse bactérienne telle que le rapportent les figures n° 33 et 34 ou l'on peut constater la présence des bactéries pigmentées chez le sujet sain et malade avec une différence significative dans le nombre de ces dernières.

Ces résultats corroborent avec ceux de **Chardin et al., 2006**, qui rapportent que la plupart des individus abritent en un petit nombre ces pathogènes dans leur sulci, qui semblent en équilibre avec le reste de la communauté bactérienne sous-gingivale, et avec l'hôte qui ne manifeste aucun signe clinique. En effet, la maladie parodontale se développe quand l'équilibre de la

communauté bactérienne sous-gingivale est rompu en faveur des bactéries parodontopathogènes, qui remplacent le microbiote commensal (**Chardin et al., 2006**). Les raisons de ce déséquilibre n'ont pas été démontrées clairement. Car il est difficile d'expliquer le déséquilibre, en raison de la complexité de la composition de la flore parodontale et sa différence d'un site à un autre chez le même sujet et sa différence aussi d'un sujet à un autre (**Haffajee and Socransky, 2005 , ; Massif, L. Frapier, 2007**).

De nombreuses études portant sur la maladie parodontale, suggèrent une grande influence des facteurs environnementaux (potentiel d'oxydo-réduction, pH, disponibilité des nutriments, etc.) et des interactions bactériennes sur la composition et l'activité de la microflore sous-gingivale (**Labbé et al., 1998**). Ceci peut être expliqué par les interactions bactériennes négatives qui sont la compétition et l'antagonisme. Ainsi, les bactéries produisent des métabolites (catalase, bactériocine, acide,...) qui inhibent d'autres populations et altèrent l'environnement physicochimique (**Labbé et al., 1998 , ; Chardin et al., 2006 , ; Dahlen, 2009**).

Selon la littérature scientifique (**Chardin et al., 2006**), tous les types clonaux d'une espèce bactérienne ne sont pas virulents. Donc, si un pathogène suspect est retrouvé dans un site sain, il peut s'agir d'une souche avirulente. D'autre part, une souche virulente n'exprime pas sa virulence en permanence et une souche avirulente peut devenir virulente (**Chardin et al., 2006**).

Colonies pigmentées en noir

cône de papier absorbant

Gélose Columbia au sang

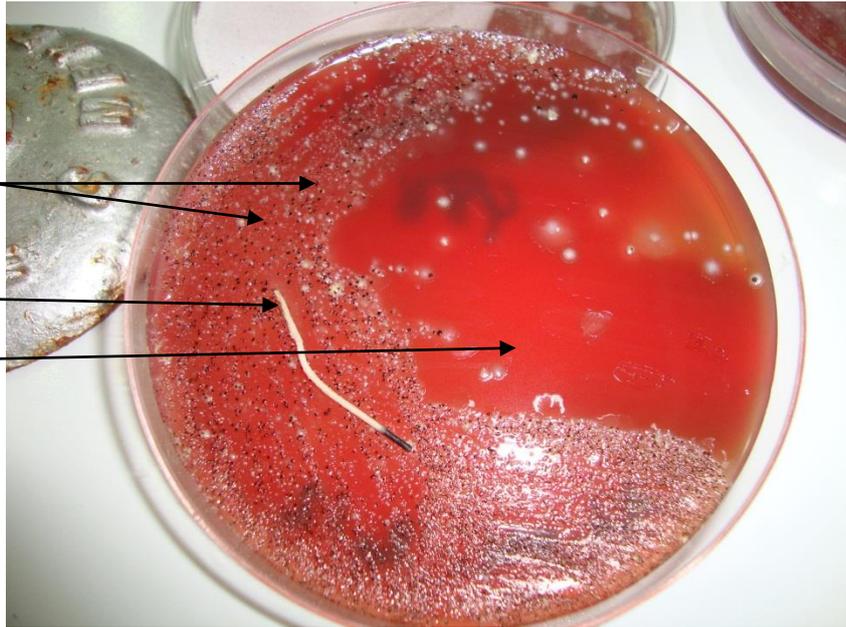


Figure n° 33 : Photo de la boîte de pétri initiale coulée avec la gélose columbia additionnée de 5% du sang de mouton etensemencée d'un prélèvement de la poche parodontale

petites colonies pigmentées en noir

Gélose Columbia au sang

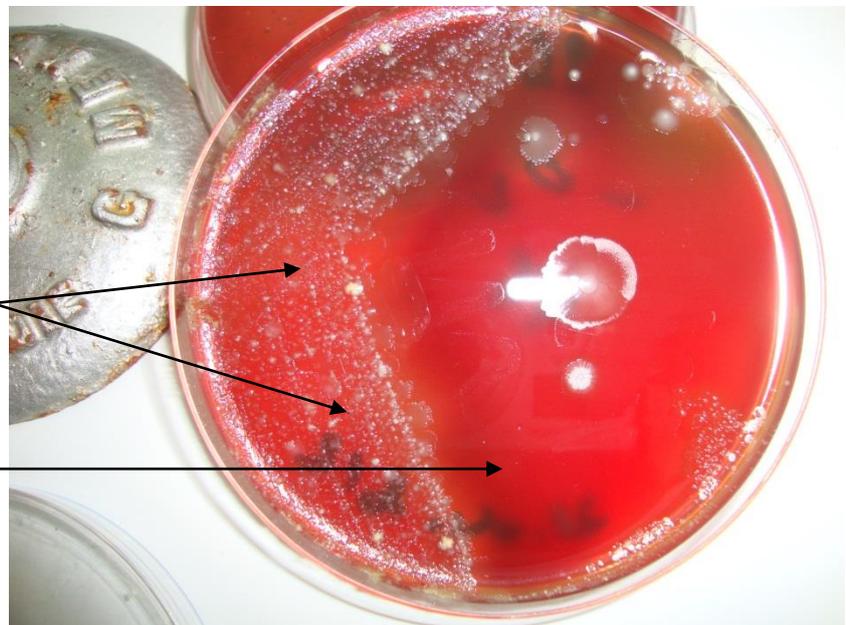


Figure n° 34 : Photo de la boîte de pétri initiale coulée avec la gélose columbia additionnée de 5% du sang de mouton etensemencée d'un prélèvement de patient sain

5.3.1. Coloration de Gram d'un prélèvement intrasulculaire

5.3.1.1. Flore des sillons sains

Nous avons effectué la coloration de Gram d'un prélèvement de la boîte initialeensemencée à partir d'un patient sain. Le résultat est illustré sur la figure n° 35. Nous remarquons la dominance des cocci à Gram positif et négatif qui représentent probablement le genre *Streptococcus* anaérobies facultatifs et *Neisseria* aérobies anaérobies facultatifs. Des bacilles à Gram négatifs comme *Fusobacterium* anaérobie stricte sont également retrouvés.

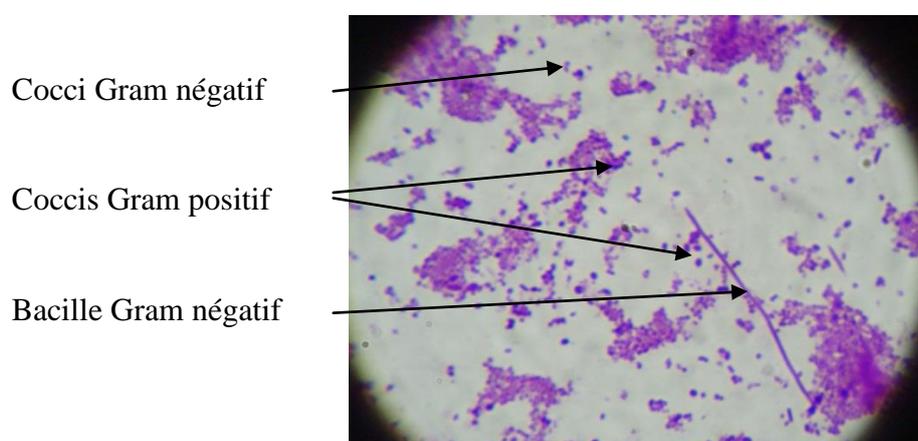


Figure n° 35 : Photo d'une observation microscopique d'une flore d'un sulcus sain

5.3.1.2. Flore des maladies parodontales

La figure ci-dessous (fig. n° 36) montre la présence d'un grand nombre de cocci, des cocobacilles et des bacilles à Gram négatifs qui représentent la flore d'une parodontite chronique. Cette flore est composée de *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens* et *Treponema*. Egalement, nous remarquons la présence des *Streptococcus* à Gram positif dans un nombre réduit.

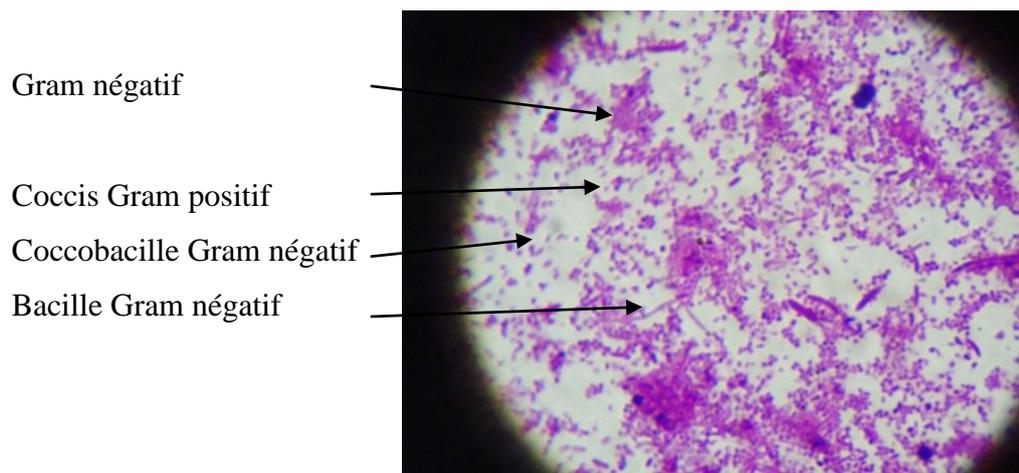


Figure n° 36: Photo d'une observation microscopique d'une flore de parodontite chronique

Nous constatons d'après ces figures, que la composition de la flore du sillon gingivale change avec le développement de la maladie où les bactéries du genre *Streptococcus* à Gram positif sont remplacées par des bactéries à Gram négatif.

Des résultats similaires ont été obtenus par des chercheurs au cours de leurs études, qui ont établi des associations particulières entre la présence de certaines espèces bactériennes dans les poches parodontales et les diverses formes de maladies parodontales. Il devient évident, que la virulence des agents pathogènes parodontaux tels que *P. gingivalis* acquiert une importance que dans le cadre d'une communauté microbienne synergique, qui est nécessaire pour l'expression de la pathogénicité (**Massif et Frapier, 2007**).

Au cours de cette étude, nous avons observé un lien entre l'état de santé générale des patients et la maladie parodontale. En effet, la plupart des prélèvements qui ont permis d'isoler le *P. gingivalis* et *P. intermedia* ont été effectués à partir des patients atteints d'hyperglycémie et d'hypertension. Ainsi, une étude portant sur les facteurs de risque pouvant influencer le développement de la maladie parodontale, a montré que les sujets diabétiques et hypertendus ou autres atteints de maladies systémiques sont plus vulnérables à cette pathologie (**Dahlen, 2009**).

De plus, aucune colonie pigmentée n'apparaît dans la culture des prélèvements appartenant à des patients sous chimiothérapie. Il semblerait que cette dernière inhibe la croissance de ces souches en faveur d'autres qui peuvent causer la maladie.

En effet, **Dahlen** explique que certains médicaments cytotoxiques utilisés dans le traitement du cancer possèdent une forte activité antibactérienne, ce qui peut entraîner une diminution du nombre des bactéries sensibles et augmenter le risque de prolifération des agents pathogènes

opportunistes moins sensibles. Ces médicaments chimio thérapeutiques peuvent également modifier l'interaction entre le récepteur des bactéries pathogènes et des cellules épithéliales, en faveur d'une amélioration de l'adhérence d'agents pathogènes opportunistes (**Dahlen, 2009**).

Le port d'un appareil ODF est un facteur aggravant la maladie parodontale. La culture de prélèvements appartenant à un patient portant l'appareil ODF présentait un nombre important de colonies pigmentées noir (**Massif et Frapier, 2007**).

Dans leurs travaux, des chercheurs ont expliqué que la seule contre-indication au traitement orthodontique chez des patients atteints de maladie parodontale est la persistance d'une inflammation gingivale. D'autres précisent que l'orthodontie est incapable de provoquer les poches parodontales, mais qu'elle aggrave la destruction tissulaire, entraînant des pertes d'attaches et une lyse osseuses irréversibles. Ainsi, l'orthodontie est possible chez des patients présentant un parodonte réduit, à condition toutefois de respecter certains principes mécaniques et d'établir une maintenance parodontale perorthodontique rigoureuse (**Massif et Frapier, 2007**).

5.3.2. Isolement, purification et identification des souches: *Porphyromonas gingivalis* et *Prevotella intermedia*

Suite à plusieurs repiquages dans la gélose columbia à 5% du sang de mouton enrichi en hémine et vitamine K1 (phytoménadione), nous avons pu avoir des boîtes contenant des colonies pigmentées noir pures. La pigmentation noire est due à la production de la protoporphyrine par ces espèces.

Dans un premier temps, l'identification a été faite par une observation au microscope de ces cultures après une coloration de Gram qui montre la présence des cellules de formes coccobacille et bacille à Gram négatif, immobiles et non sporulées.

En même temps, des galeries Api 20 A ont été préparées pour identifier ces souches à partir de leur caractère biochimique. Les résultats obtenus montrent l'existence de deux types de bactéries. Des souches qui sont asaccharolytiques, indoligènes, ne dégradent pas l'esculine (Tableau n° 18. Figure n° 37). Elles sont inhibées par: Pénicilline, ampicilline, ticarcilline, cefazoline, cefoxitine, cefotaxime, piperacilline, imipenem, tetracycline et metronidazole. Par

contre, elles résistent aux: kanamycine, erythromycine, clindamycine, vancomycine et sulfametoazole.

La lecture de la galerie dans le catalogue analytique, nous a permis de confirmer l'appartenance de ces critères au genre de *Porphyromonas asaccharolytica* (tableau n°19)

D'autres souches ont présenté des critères différents dans leur galerie biochimique. Elles sont saccharolytiques, inhibées par: Ticarcilline, ceftaxime, cefotaxime, imipenem, amox+ ac. Clavulnique, tetracycline et metronidazole. Cependant, elles résistent aux: Pénicilline, ampicilline, cefazoline, kanamycine, erythromycine, clindamycine, vancomycine et sulfametoazole (Tableau n° 19). La lecture sur le catalogue analytique a permis d'identifier la souche de *Prevotella intermedia*.

Chez *Prevotella spp.*, la résistance acquise aux β -lactamines est essentiellement due à la production d'une céphalosporinase appartenant à la famille des CfxA qui hydrolyse les aminopénicillines, les céphalosporines de première génération, le céfuroxime ainsi que les céphalosporines de troisième génération orales (Alauzet, 2009).

Tableau n° 18 : Caractères biochimiques des deux souches étudiées *P. gingivalis* et *P. intermedia*

Souches bactériennes	Fermentation des sucres																					
	Indole	Urée	Glucose	Mannose	Lactose	Saccharose	Maltose	Salicine	Xylose	Arabinose	Gel	Esculine	Gly	Cellulose	Mne	Mlz	Raffinose	Sor	Rha	Tre	Cat	
<i>P. gingivalis</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. intermedia</i>	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-

(+)Positif : Hydrolyse

(-) négatif : pas d'hydrolyse

Résultats et discussion

Chapitre 5

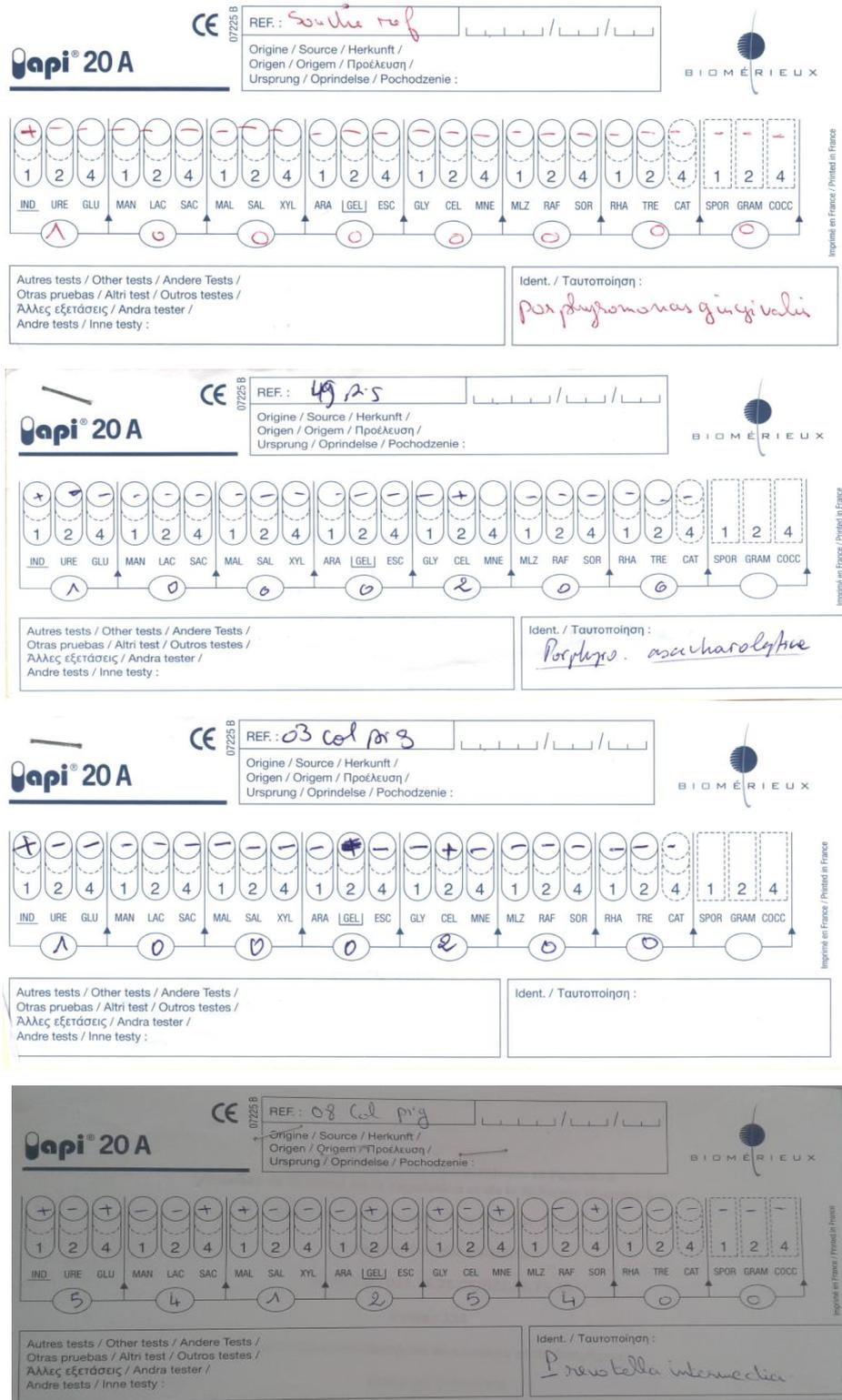


Figure n° 37: Identification de la souche de référence *P. gingivalis* et des souches cliniques selon leurs critères biochimiques

Tableau n° 19 : Antibiogramme des deux souches étudiées *P. gingivalis* et *P. intermedia*

Antibiotiques	<i>P. gingivalis</i>		<i>P. intermedia</i>	
	Diamètre	Interprétation	Diamètre	interprétation
Pénicilline	>40	Sensible	<06	Résistante
Ampicilline/Amoxicilline	>40	Sensible	32	Résistante
Ticarcilline	>40	Sensible	>40	Sensible
Cefazoline	>40	Sensible	<06	Résistante
Cefoxitine	>40	Sensible	40	Sensible
Cefotaxime	>40	Sensible	>40	Sensible
Piperacilline	>40	Sensible	-	-
Imipenem	>40	Sensible	>40	Sensible
Amox+ac.clavulanique	>40	Sensible	>40	Sensible
Kanamycine	<06	Résistante	<06	Résistante
Chloramphenicol	-	-	-	-
Tetracycline	>40	Sensible	31	Sensible
Erythromycine	>40	Sensible	<06	Résistante
Clindamycine 15UI	>40	Sensible	<06	Résistante
Rifampicine	-	-	-	-
Sulfametoazole	≤06	Résistante	<06	Résistante
Vancomycine	>40	Sensible	<06	Résistante
Metronidazole	<40	Résistante	31	Sensible

En pratique, l'identification de ces espèces à partir du catalogue analytique doit reposer sur une probabilité qui dépasse un pourcentage de 99%. Ainsi, le profil de sensibilité aux antibiotiques n'est pas suffisant pour que l'identification des souches soit correcte. Seules, les méthodes moléculaires comme la PCR et le séquençage sont plus fiables. Une autre technique alternative peut aussi être efficace dans l'identification des souches est la spectrométrie de masse MALDI-TOF.

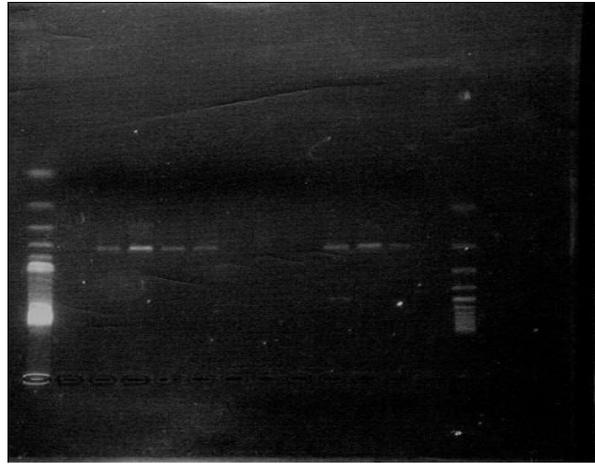
5.3.2.1. Identification de la souche *P. gingivalis* par PCR

Cette technique est basée sur l'extraction et l'amplification par la chaîne polymérase (PCR) de l'ADN codant pour l'ARN ribosomique 16S, pour identifier la bactérie *P. gingivalis* chez 20 patients atteints de maladie parodontale. Les résultats sont illustrés par les figures n° 38 ci-dessous.

L'amplification du gène codant pour l'ARNr 16S de *P. gingivalis* ATCC 33277 a permis d'avoir 4 bandes d'un poids moléculaire de 100 Pb, ce qui signifie que le gène amplifié de cette souche est de 400Pb. Nous avons noté des similitudes avec d'autres *P. asaccharolytica*

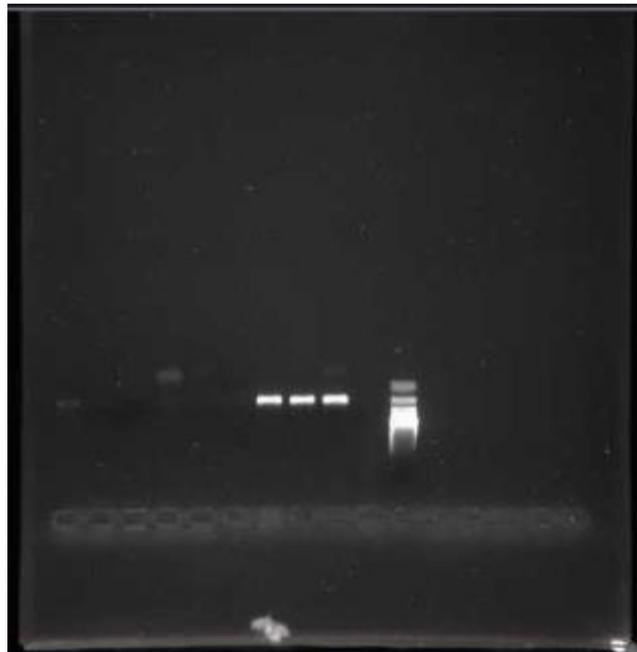
identifiées par la galerie Api 20A, ce qui confirme que ces dernières appartiennent au genre *P. gingivalis*.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



(1) PM 100pb, (2-11) souches à identifier, (12) témoin positif *P. gingivalis* 33277, (13) témoin négatif, (14) PM 200pb

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



(1-8) souches à identifier, (9) témoin positif *P. gingivalis*, (10) témoin négatif, (11) PM 200pb

Figure n° 38 : Photos des bandes d'ADN obtenues sur la plaque du gel d'électrophorèse

5.3.2.2. Identification de *P. intermedia* et *P. gingivalis* par la technique de spectrométrie de masse MALDI-TOF / MS

Au cours de ces dernières années, une nouvelle méthode a été développée pour le diagnostic moléculaire des maladies infectieuses, la détermination du profil direct des protéines en utilisant la spectrométrie de masse MALDI – TOF, qui est utilisée pour l'identification rapide et le typage des microorganismes (**Afanasev et al., 2014**). C'est un outil prometteur dans l'identification des bactéries. Cette technique présente de multiples avantages (rapidité des résultats, simplicité du protocole, coût des analyses) sur l'identification moléculaire. Elle est également connue par une sensibilité et une spécificité diagnostiques élevées, ce qui rend cette approche très prometteuse pour l'identification des bactéries dans les laboratoires de routine (**Wieser et al., 2012 ; Nagy et al., 2012 ; Mellmanne et Müthing, 2013 ; Afanasev et al., 2014**). De même, MALDI-TOF / MS a contribué au diagnostic des tumeurs, de l'arthrite rhumatoïde, de la maladie d'Alzheimer et des allergies par l'identification de marqueurs biochimiques spécifiques (**Wieser et al., 2012**).

La méthode est basée sur l'analyse des protéines ribosomales de faible masse moléculaire conservées, habituellement dans la gamme de 2000 à 14000 m / z (**Nagy et al., 2012**).

Les souches et leurs profils spectrométriques de masse correspondants sont illustrés par les figures n° 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 et 48.

L'identification des souches cliniques anaérobies isolées à partir des poches parodontales par la technique MALDI-TOF / MS a permis de confirmer la présence de la bactérie *P. intermedia*, avec des valeurs de score (SV) de 1,751 à 2,104. Lorsque ces valeurs dépassent 2, l'identification de la bactérie *P. intermedia* est très fiable.

Cette différence des valeurs de score pourrait être due à la préparation des échantillons qui est un facteur important qui contribue à la qualité de l'analyse (**Wieser et al., 2012**). En effet, le même chercheur a étudié la performance de la technique MALDI-TOF / MS et a montré que la durée de l'incubation influe également sur la fiabilité de la technique car, en augmentant le temps de culture, des pics plus faibles et moins distingués apparaîtront dans les spectres. Cet effet est probablement dû à la dégradation des protéines ribosomales et conduit à une identification moins efficace des espèces (**Mellmann et Müthing, 2013**).

L'identification de certains microorganismes avec une paroi cellulaire rigide (par exemple, une levure) nécessite une procédure d'extraction courte pour rendre les protéines ribosomales

disponibles pour l'analyse et pour fournir un spectre de masse utilisable (**Mellmann et Müthing, 2013**).

Des différences mineures entre les résultats de différenciation biochimiques, moléculaires et MALDI-TOF / MS ont été observées. L'identification des agents pathogènes par la technique de MALDI-TOF / MS est basée sur l'analyse des spectres de protéines ribosomales. Les résultats de cette technique sont donc étroitement liés aux résultats des comparaisons de la base de données des séquences 16s-rDNA. Par conséquent, les espèces qui ne diffèrent pas suffisamment dans les séquences ribosomales, telles que *Shigella spp.* et *Escherichia coli* ou *S. pneumoniae* (pneumocoque) et les membres du groupe *S. oralis / mitis*, ne peuvent être distinguées par MALDI-TOF / MS. C'est là que les tests biochimiques classiques, la détection des antigènes ou les méthodes moléculaires sont nécessaires (**Wieser et al., 2012**).

D'autres travaux de recherche prouvent que la valeur de SV dépend significativement de la méthode de préparation des échantillons. Ils révèlent aussi que les résultats de la technique MALDI-TOF sont plus fiable lorsqu'on procède à extraire les protéines ribosomales (**Afanasev et al., 2014**).

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (+)	Prevotella intermedia DSM 20706T DSM	1.846	28131

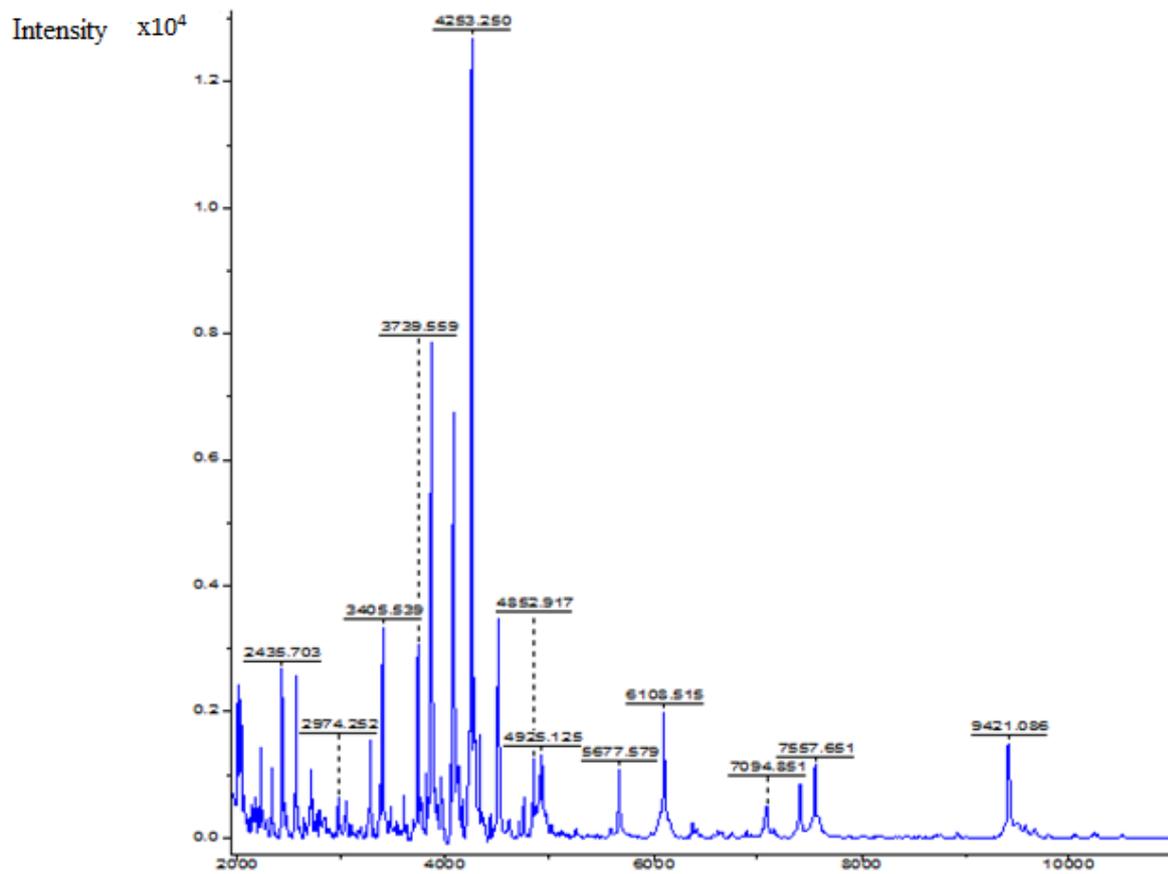


Figure n° 39 : Spectre Maldi-tof de la souche clinique *Prevotella intermedia* avec un score de 1.846

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (++)	Prevotella intermedia DSM 20706T DSM	2.104	28131

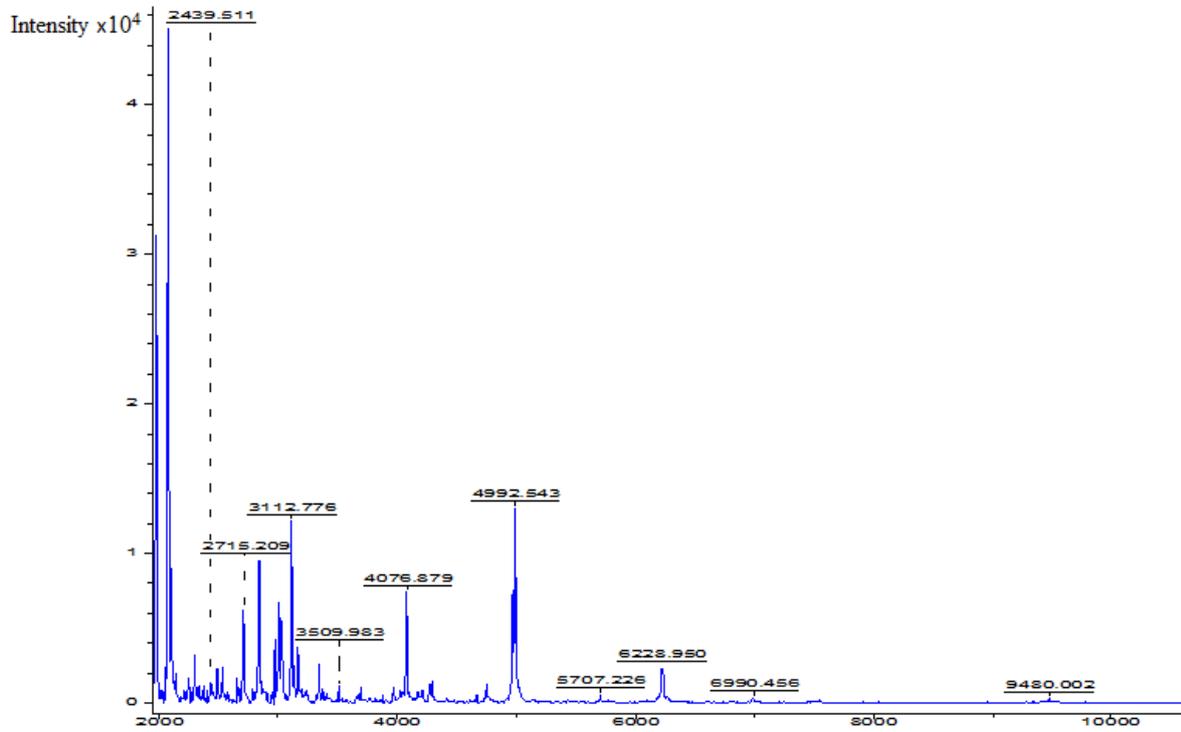


Figure n° 40 : Spectre Maldi-tof de la souche clinique *Prevotella intermedia* avec un score de 2.104

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (+)	<i>Prevotella intermedia</i> DSM 20706T DSM	1.966	28131

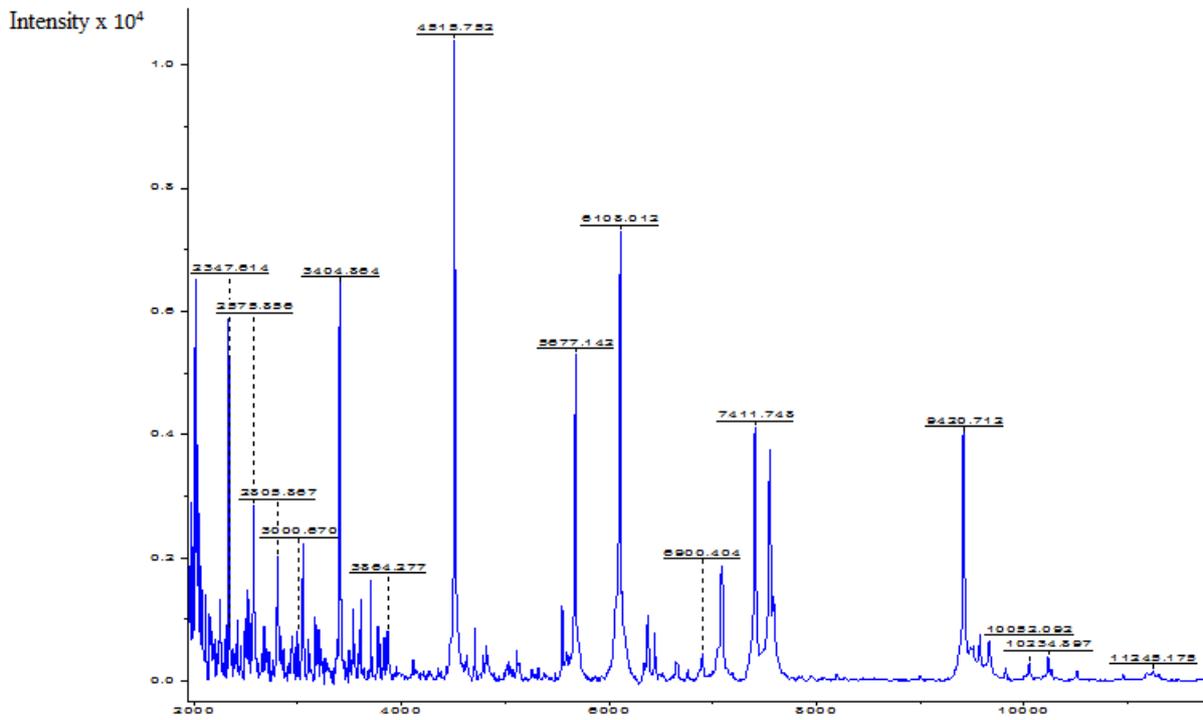


Figure n° 41: Spectre Maldi-tof de la souche clinique *Prevotella intermedia* avec un score de 1.966

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (+)	Porphyromonas gingivalis DSM 20709T DSM	1.834	837

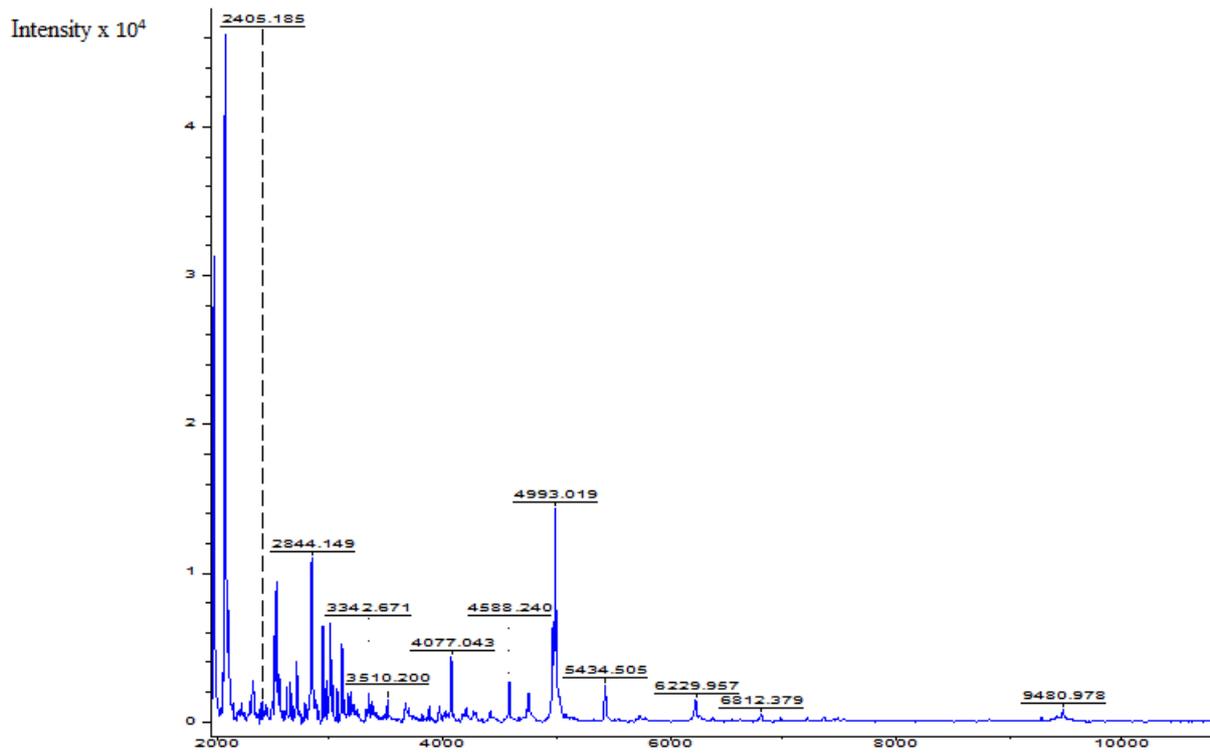


Figure n° 42: Spectre Maldi-tof de la souche clinique *Porphyromonas gingivalis* avec un score de 1.834

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (+)	Porphyromonas gingivalis DSM 20709T DSM	1.982	837

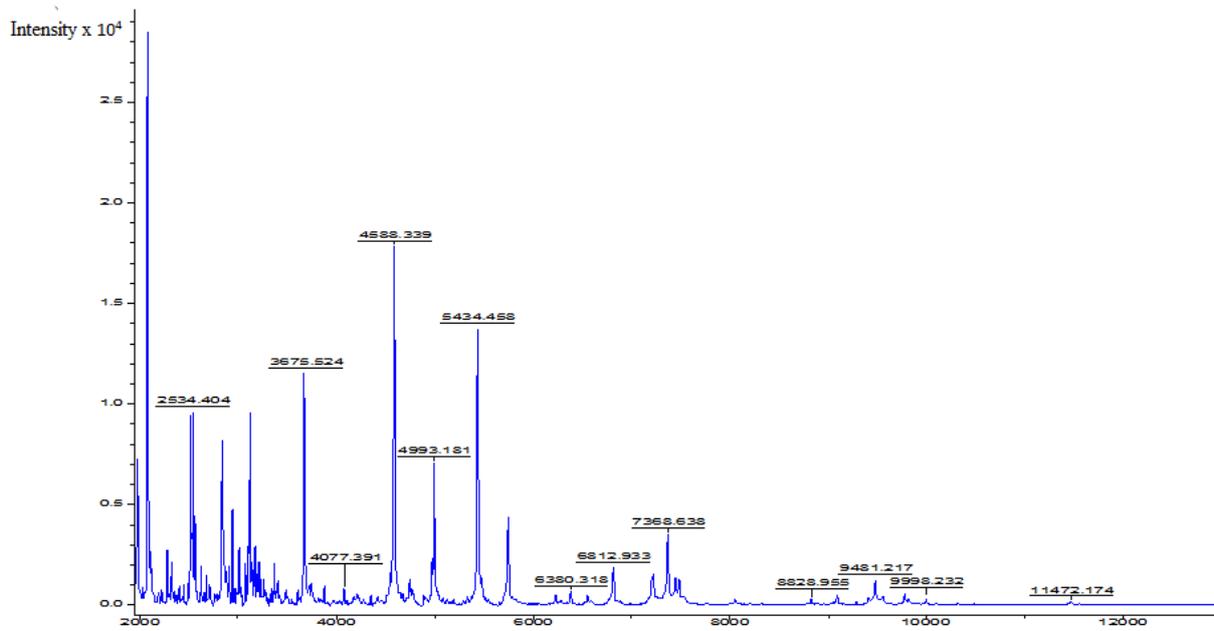


Figure n° 43 : Spectre Maldi-tof de la souche clinique *Porphyromonas gingivalis* avec un score de 1.982

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (+)	<i>Prevotella intermedia</i> DSM 20706T DSM	1.826	28131

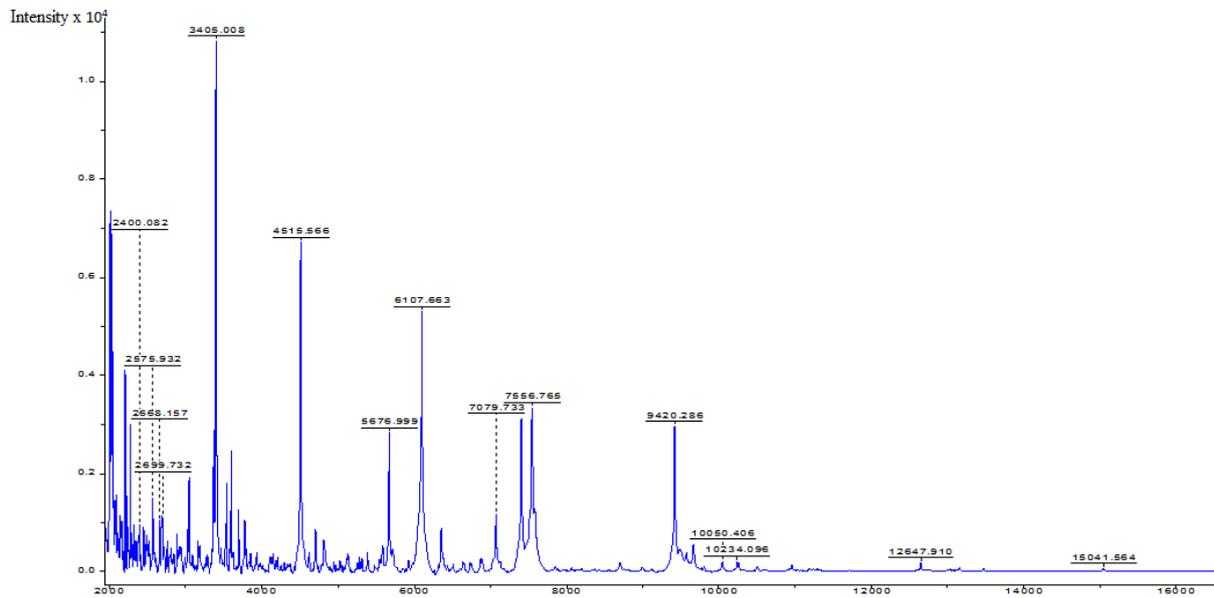


Figure n° 44 : Spectre Maldi-tof de la souche clinique *Prevotella intermedia* avec un score de 1.826

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (+)	Porphyromonas gingivalis DSM 20709T DSM	1.751	837

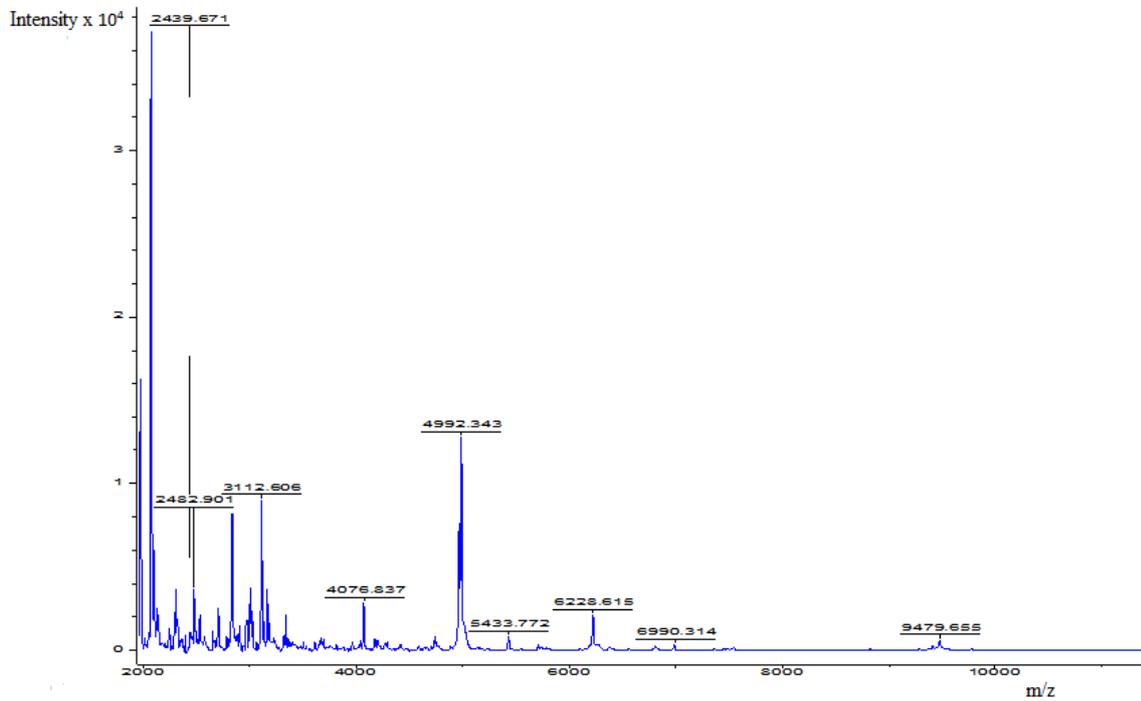


Figure n° 45 : Spectre Maldi-tof de la souche clinique *Porphyromonas gingivalis* avec un score de 1.751

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (++)	Prevotella intermedia DSM 20706T DSM	2.066	28131

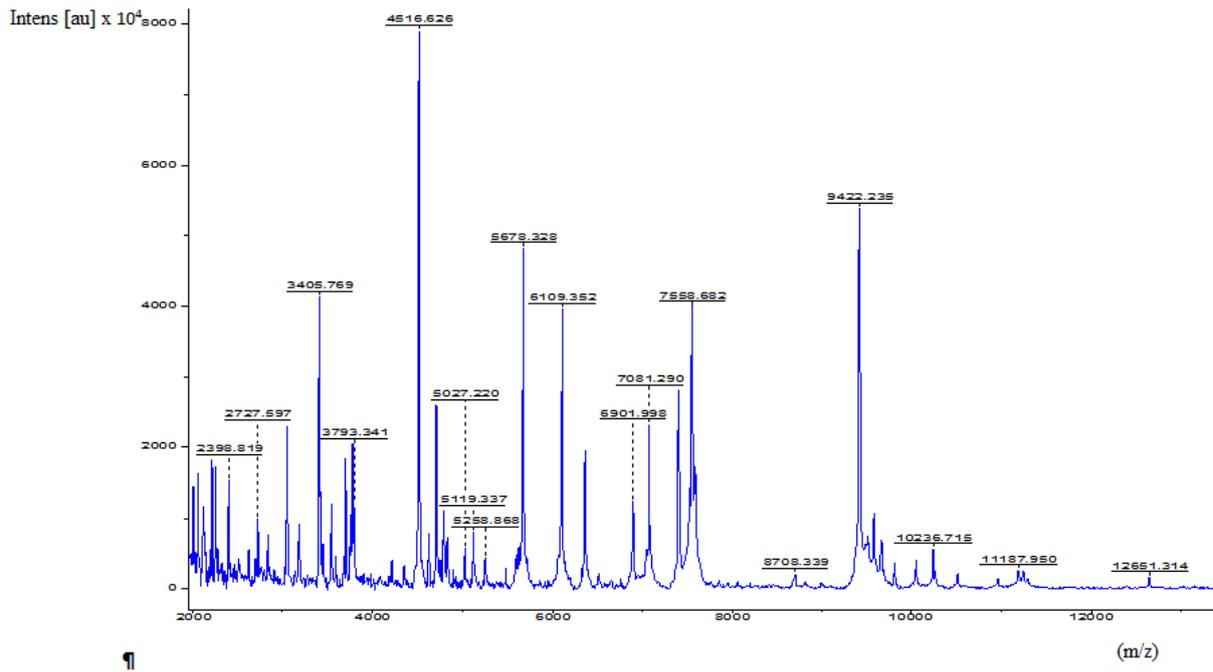


Figure n° 46 : Spectre Maldi-tof de la souche clinique *P. intermedia* avec un score de 2.066

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (++)	Prevotella intermedia DSM 20706T DSM	2.104	28131

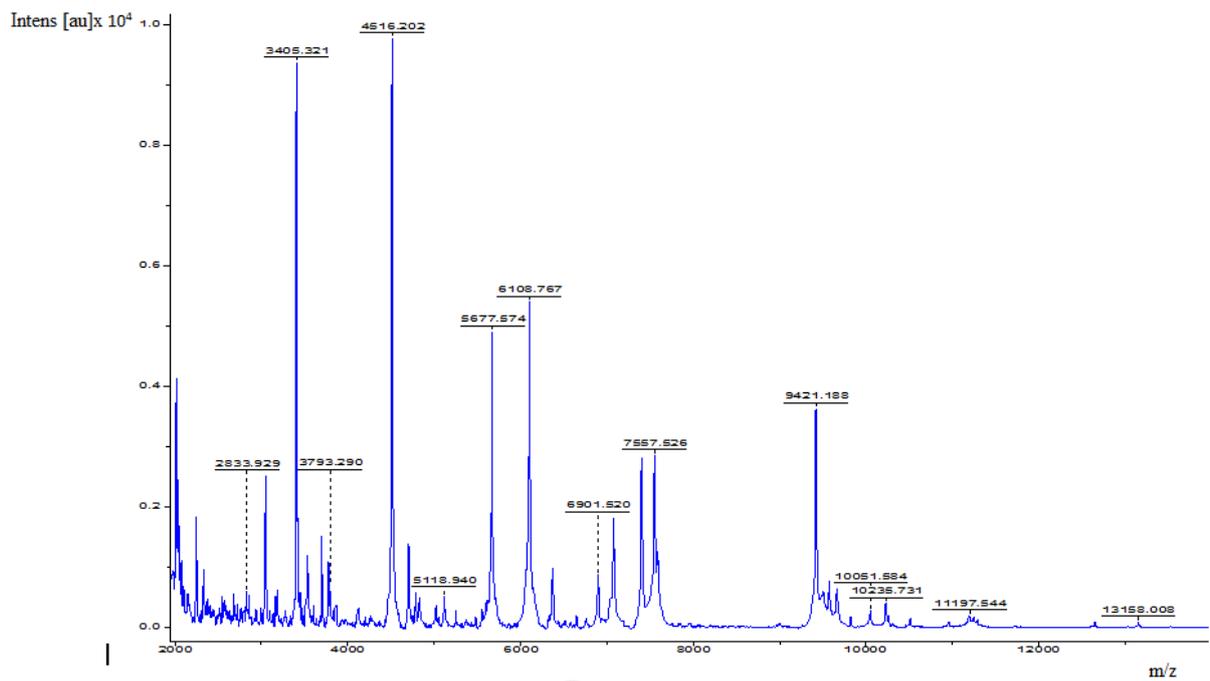


Figure n° 47 : Spectre Maldi-tof de la souche clinique *P. intermedia* avec un score de 2.104

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (+)	Prevotella intermedia DSM 20706T DSM	1.921	28131

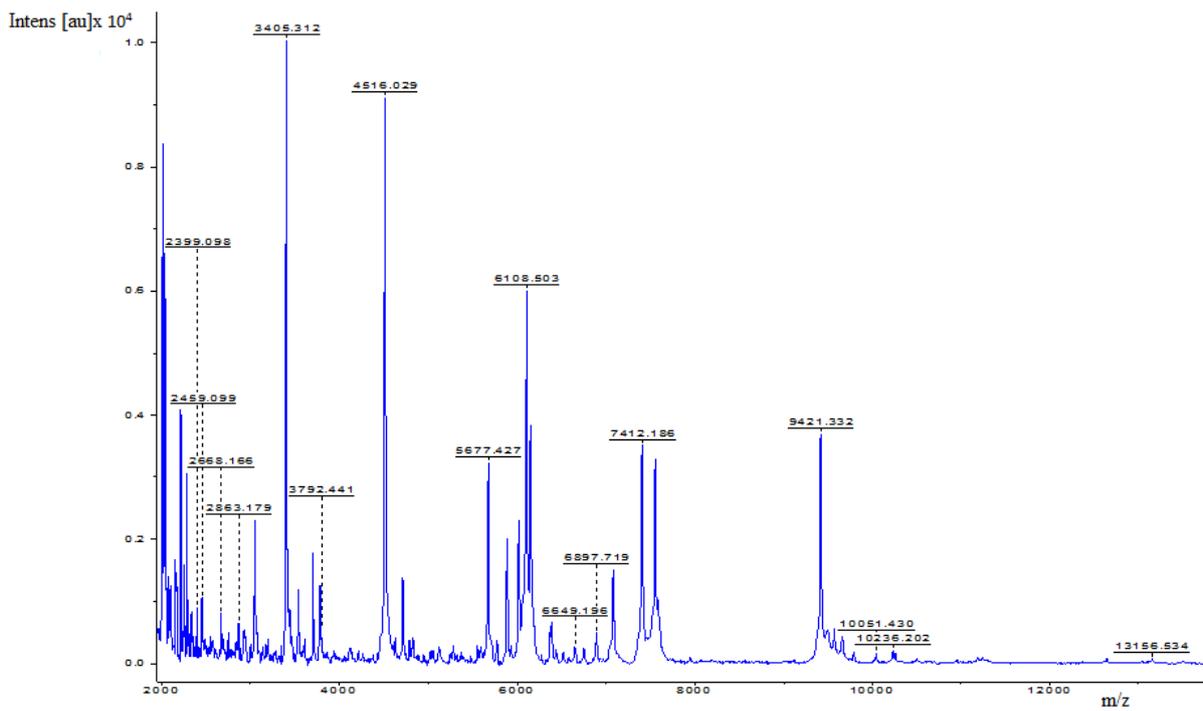


Figure n° 48 : Spectre Maldi-tof de la souche clinique *P. intermedia* avec un score de 1.921

Pour confirmer les résultats obtenus par la technique MALDI-TOF / MS sur la souche *P. intermedia*, une identification de certaines souches utilisant le séquençage de l'ARN 16S a été effectuée.

5.3.2.3. Identification de la souche *P. intermedia* par le séquençage de l'ARN 16S

Les méthodes classiques d'identification bactérienne basées sur la détermination des caractères cultureux, physiologiques et métaboliques ont montré leurs limites (**Boussaber et al., 2013**). L'avènement de la biologie moléculaire dans les années 1990, a apporté de nouveaux moyens pour l'étude des organismes et des organismes «non cultivables». L'amplification enzymatique de l'ADN (PCR) permet, en effet, l'accès à la séquence des gènes bactériens sans étape de culture (**Dauga et al., 2005**).

De nombreux marqueurs ont été proposés comme horloges moléculaires, apportant chacun les informations plus ou moins pertinentes selon les groupes bactériens étudiés et les types de relations étudiées (anciennes et récentes). Les plus utilisés et les mieux renseignés sont les gènes des ARN ribosomiques (ARNr), notamment celui de l'ARNr 16S (**Alauzet, 2009**).

En effet, l'ARN ribosomique 16S (ARNr 16S) a une longueur de 1550 pb et il a été choisi comme marqueur phylogénétique du fait de son universalité liée à son rôle clé dans la traduction de l'ARNm en protéines, de sa structure mosaïque incluant des régions conservées, variables et hypervariables, et de son abondance dans les cellules (**Dauga et al., 2005 ; , Hassaine, 2013**).

Les arbres phylogénétiques représentent les relations phylogénétiques entre les séquences nouvellement obtenues et des séquences de référence dans les banques de données (**Boussaber et al., 2013**).

La relation phylogénétique entre les séquences d'ARN 16S de quelques souches cliniques (QRY_998.16_1391, QRY_1000.16_639, QRY_997.16_654, QRY_996.16_643 et QRY_995.16_937) et celles des autres genres de *Prevotella* est représentée par les figures suivantes n° 49, 50, 51, 52 et 53. Cet arbre confirme que les séquences nouvellement obtenues des différentes souches isolées comparées à celles des banques de données appartiennent à l'espèce *P. intermedia*.

Les pourcentages de similarités pour les isolats obtenus sont de 98.60%, 99.34%, 96.46%, 98.10% et 98.62% pour les isolats QRY_998.16_1391, QRY_1000.16_639, QRY_997.16_654, QRY_996.16_643 et QRY_995.16_937, respectivement.

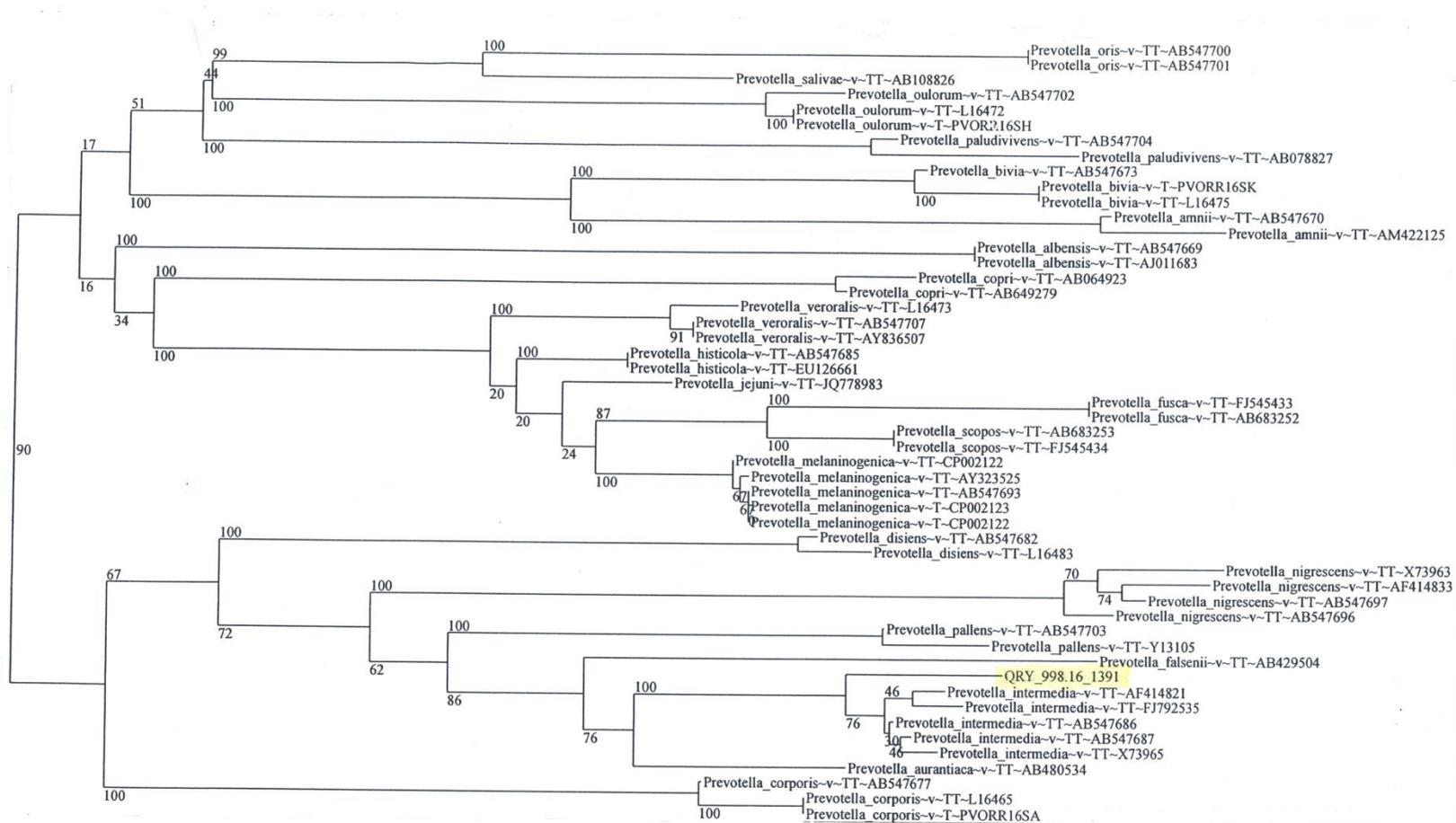


Figure n° 49 : Arbre phylogénétique basée sur les gènes codant l'ARN 16S montrant la position de l'isolat QRY_998.16_1391

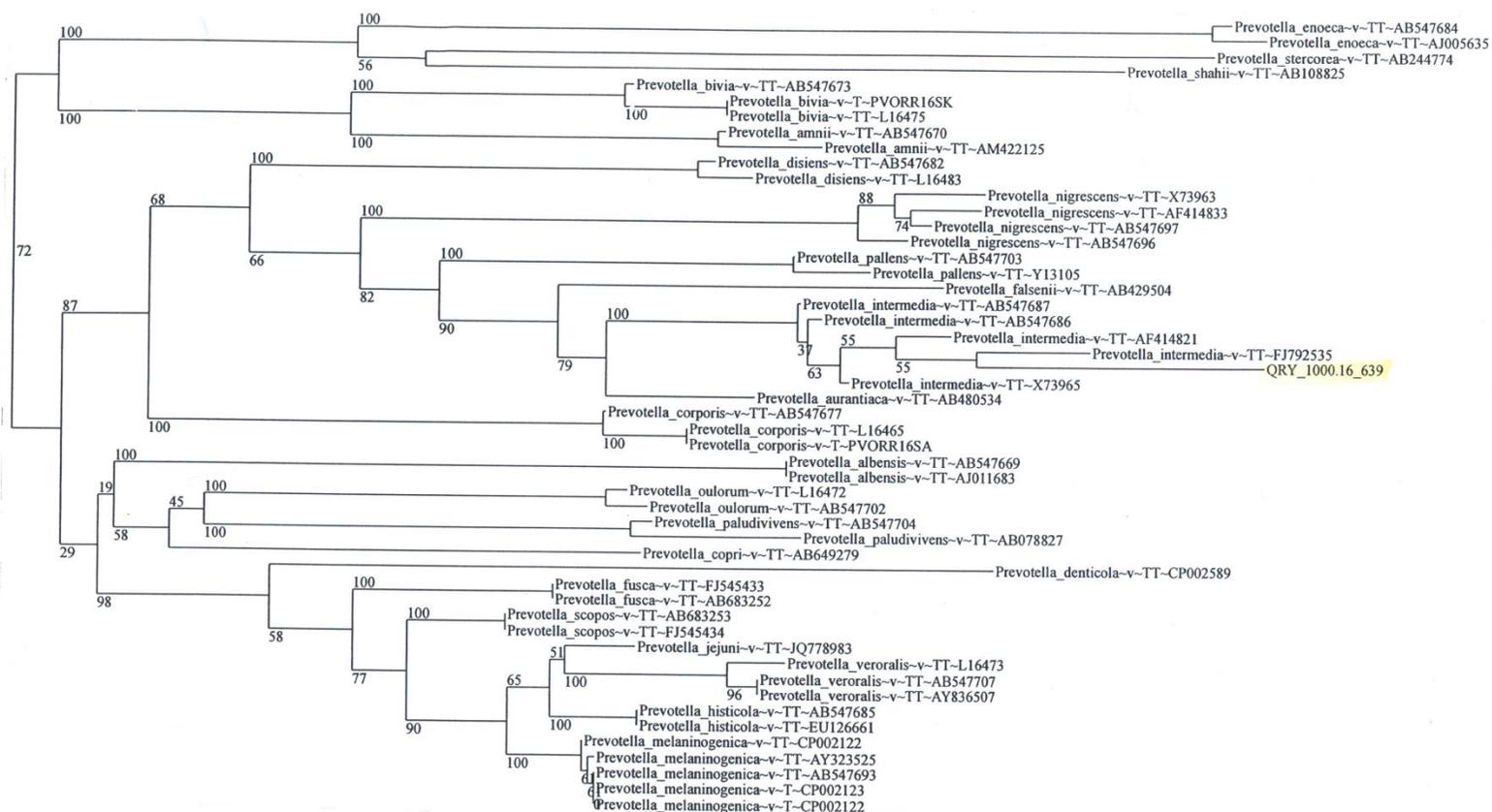


Figure n° 50 : Arbre phylogénétique basée sur les gènes codant l'ARN 16S montrant la position de l'isolat QRY_1000.16_639

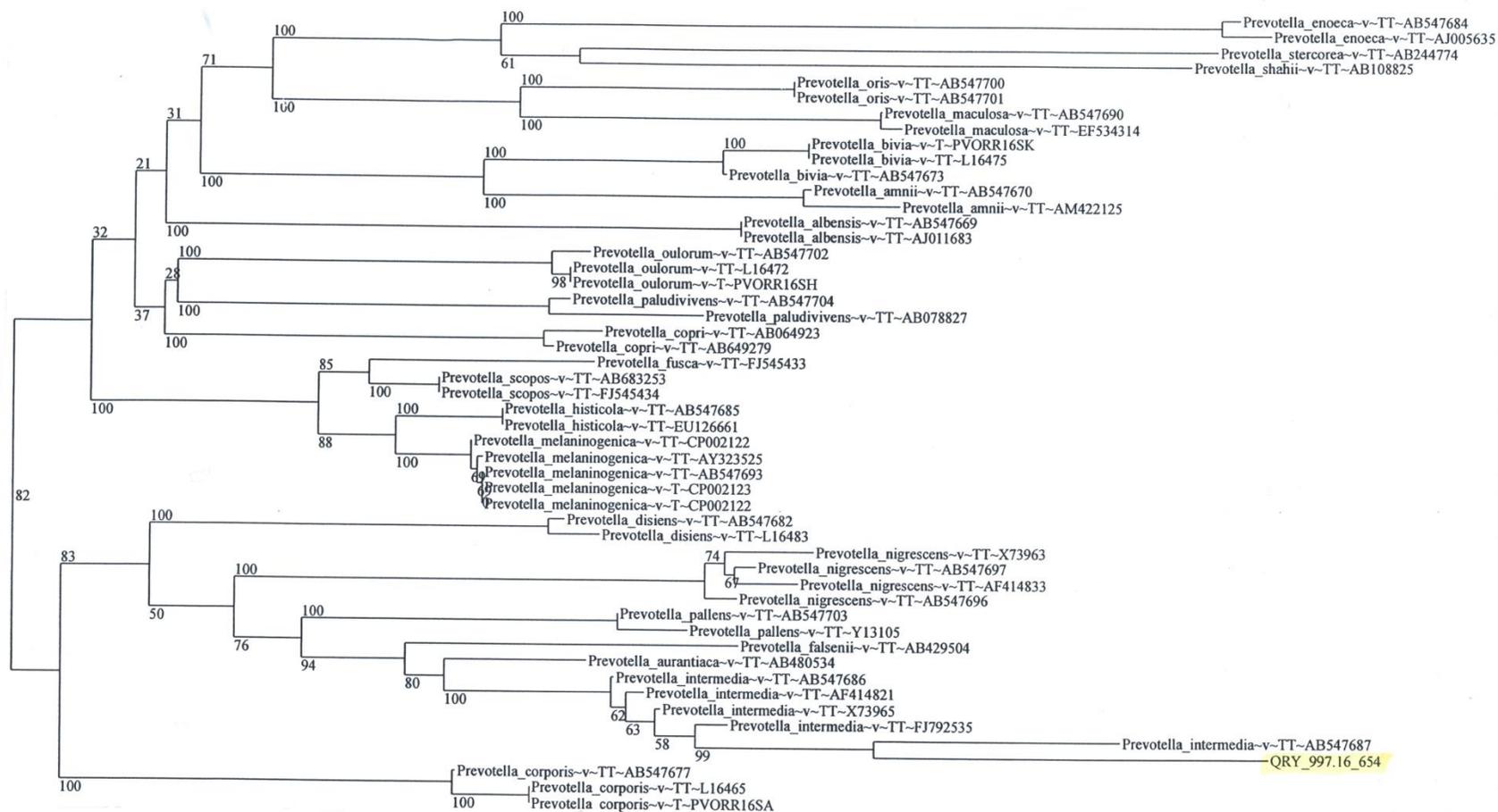


Figure n° 51: Arbre phylogénétique basée sur les gènes codant l'ARN 16S montrant la position de l'isolat QRY_997.16_654

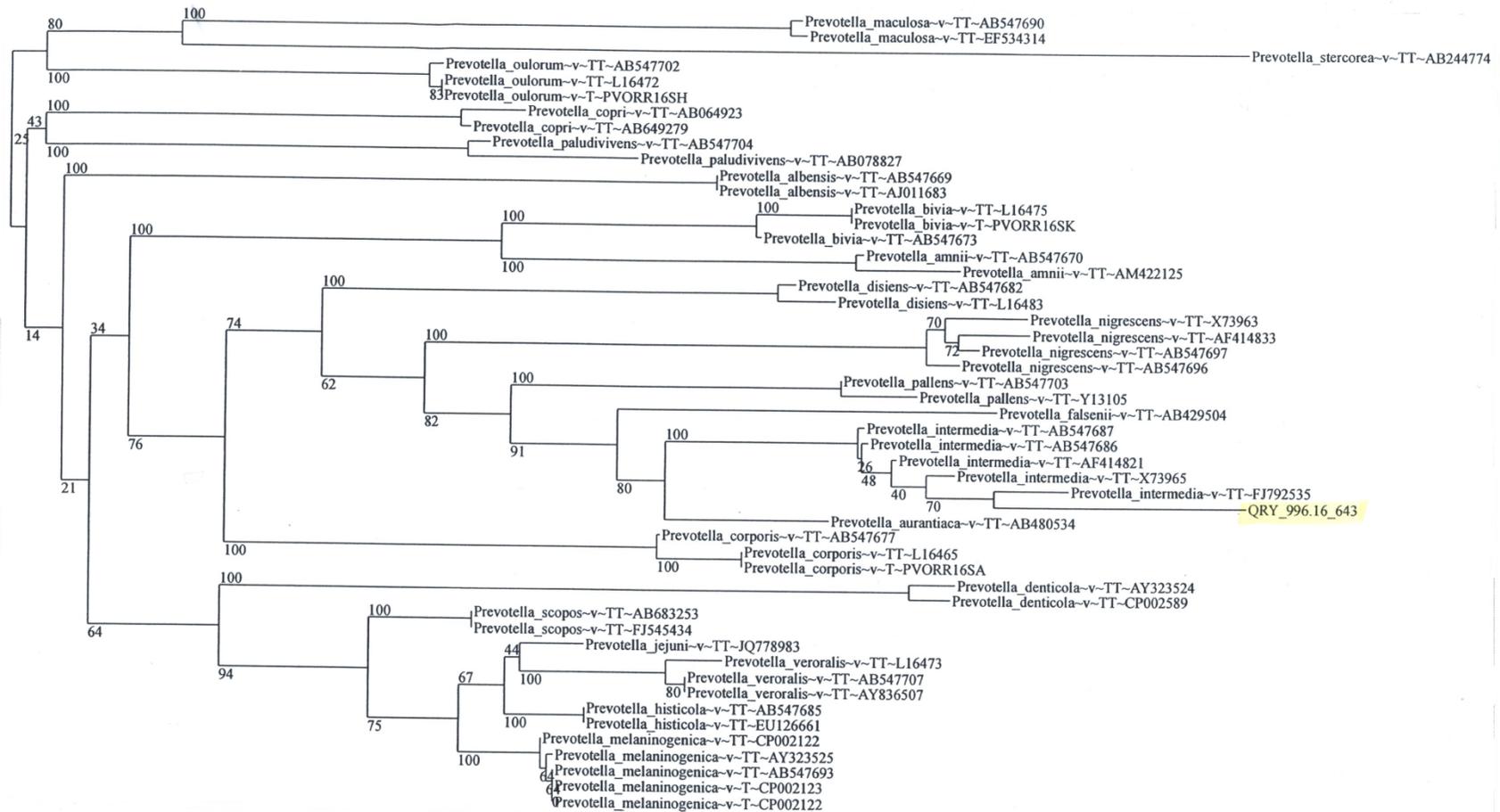


Figure n°52 : Arbre phylogénétique basée sur les gènes codant l'ARN 16S montrant la position de l'isolat QRY_996.16_643

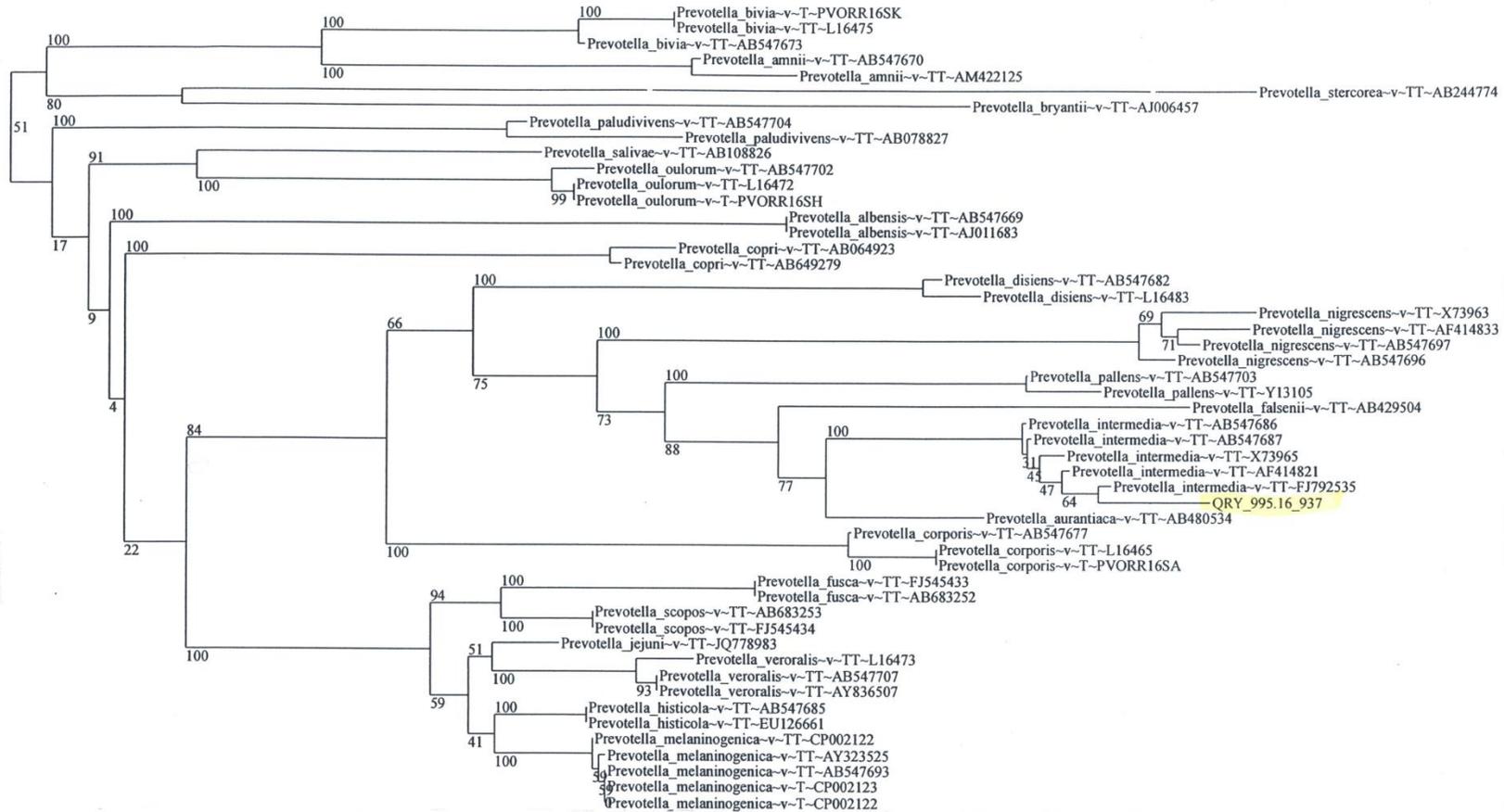


Figure n° 53 : Arbre phylogénétique basée sur les gènes codant l'ARN 16S montrant la position de l'isolat QRY_995.16_937

5.4. Etude de l'activité antibactérienne des extraits végétaux

Les résultats concernant la mise en évidence de l'activité antibactérienne des extraits végétaux par la méthode des disques, indiquent que tous les extraits présentent une activité antibactérienne vis-à-vis des souches cliniques (*P. gingivalis* et *P. intermedia*) et de la souche de référence de *P. gingivalis* ATCC 33277, avec une efficacité plus ou moins variable selon la nature de l'extrait testé, de la concentration de ce dernier et des souches testées. L'utilisation du témoin (eau distillée) a montré que ce dernier n'a exercé aucune activité inhibitrice, avec une poussée positive de toutes les souches cliniques y compris la souche de référence sur les disques témoins.

Les diamètres d'inhibition obtenus avec chaque extrait de plante et à différentes concentrations, sont présentés par le tableau n° 20 et sont exprimés en moyenne \pm écart type de trois répétitions.

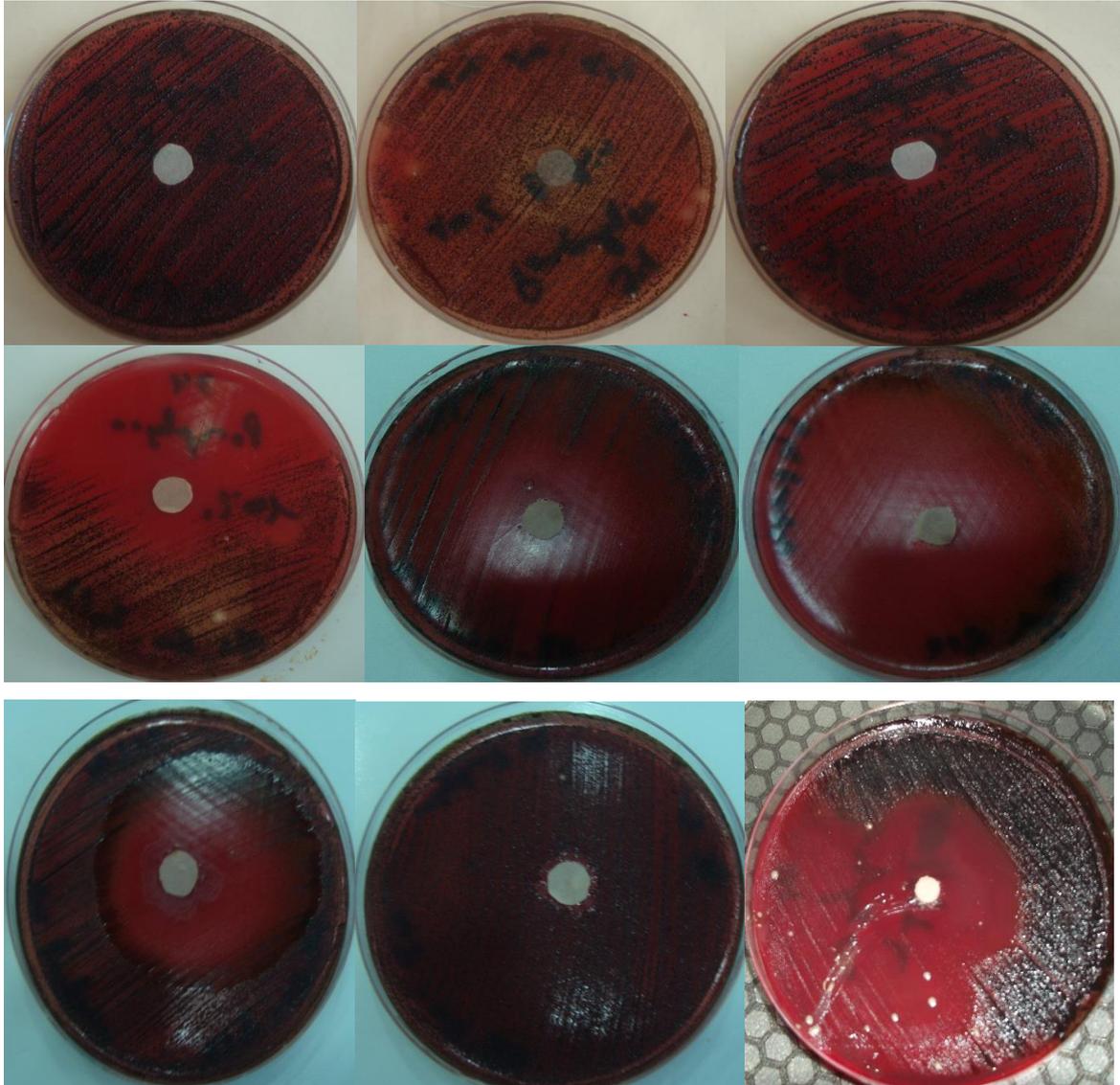


Figure n° 54 : Photos de quelques zones d'inhibition obtenues lors de la réalisation de ce travail

Résultats et discussion

Tableau n°20 : Les valeurs des diamètres d'inhibition et de la CMI obtenus en fonction des différentes concentrations des PPT des extraits végétaux utilisés sur les deux souches *P. gingivalis* et *P. intermedia*

	C _{PPT} * (mg/ml)	<i>P. gingivalis</i> (n=20) (mm)	CMI (mg/ml)	<i>P. intermedia</i> (n=20) (mm)	CMI (mg/ml)
<i>A. herba-alba</i> EAq1	0,028	Résistant	0.058	R	0.251
	0,058	31.83±0.24		R	
	0,119	36.60±0.43		R	
	0.251	41.83±1.43		20.50±1.08	
	0.498	45.87±0.84		23.33±0.85	
	1.004	49.00±0.82		36.83±1.31	
<i>O. ficus-indica</i> EAq2	2.89	R	0.03	R	0.03
	8.99	R		R	
	15.01	R		R	
	30	31.17±0.85		41.83±1.43	
	55.9	38.00±0.82		48.00±0.82	
	135.26	48.83±1.03		55.50±0.41	
<i>C. sinensis</i> EAq3	0.59	R	5.49	R	2.09
	1.01	R		R	
	2.09	R		24±00	
	5.49	21.33±2.62		29.83±0.85	
	9.99	33.17±0.39		35.93±0.82	
	20.27	42.00±0.41		41.30±0.92	
<i>P. crinita</i> EAq4	34.99	Résistante	590.82	Résistante	590.82
	71.85	Résistante		Résistante	
	146.7	Résistante		Résistante	
	280.41	Résistante		Résistante	
	590.82	07.54±0.36		10.73±0.61	
	1080.21	10.50±0.41		16.67±1.25	

C_{EAq}: concentration de l'extrait aqueux; C_{PPT}: concentration en polyphénols totaux; EAq: extrait aqueux.

Ce tableau montre que les extraits aqueux (EAq1) d'*A. herba-alba* présentent des diamètres d'inhibition du *P. gingivalis* qui varient entre 31.83±0.24 mm et 49.00±0.82 mm pour des concentrations en PPT de 0.058-1.004 mg/ml, ces résultats reflètent bien l'efficacité de cette plante dans l'inhibition du germe *P. gingivalis*. Sachant que pour la concentration en PPT de 0.028 mg/ml, le *P. gingivalis* s'est montré résistant.

Il en est de même pour les résultats obtenus avec l'EAq2 d'*O. ficus indica*, exhibant des diamètres d'inhibition vis-à-vis du *P. gingivalis*, variant entre 31.17±0.85 mm et 48.83±1.03mm, ce qui est en faveur d'une bonne activité antibactérienne. Pour les concentrations C_{PPT1}, C_{PPT2} et C_{PPT3}, le germe n'a pas été inhibé.

Les diamètres d'inhibition obtenus pour ces deux extraits (1 et 2), ne présentent pas de différences significatives ($P > 0.05$).

L'étude de l'activité de l'extrait aqueux de *C. sinensis* (EAq3) sur le *P. gingivalis* montre des zones d'inhibition dont les diamètres se situent entre 21.33 ± 2.62 mm et 42.00 ± 2.62 mm pour des concentrations en PPT de 5.49-20.27mgEAG/ml. Ces diamètres d'inhibition reflètent bien la sensibilité du *P. gingivalis* vis-à-vis de cet extrait. Les valeurs de ces diamètres présentent une différence significative ($P < 0.05$) avec ceux obtenus avec l'EAq1, mais on ne note pas de différence significative avec les résultats obtenu avec l'EAq2 ($P > 0.05$). Le *P. gingivalis* s'est révélé résistant aux concentrations : C_{PPT1} , C_{PPT2} et C_{PPT3} .

Enfin l'extrait aqueux de *P. crinita* (EAq4) a donné des diamètres d'inhibition allant de 07.54 ± 0.36 à 10.50 ± 0.41 mm. Le *P. gingivalis* s'est montré sensible que pour les concentrations C_{PPT5} et C_{PPT6} . Quant aux concentrations C_{PPT1} à C_{PPT4} le germe s'est révélé résistant. Les tests statistiques indiquent clairement une différence significative avec l'EAq1 et l'EAq2, en revanche il n'y a pas de différence significative avec l'EAq3.

Les résultats obtenus avec la souche de référence *P. gingivalis* ATCC33277 pour tous les extraits, étaient similaires à ceux obtenus avec les souches cliniques de *P. gingivalis*.

En ce qui concerne le germe *P. intermedia*, les valeurs des diamètres d'inhibition obtenus avec l'EAq1 ne présentent pas de différence significative aussi bien avec l'EAq2, l'EAq3 que l'EAq4 ($P > 0.05$). Il en est de même, pour l'EAq3 dont les valeurs des diamètres d'inhibitions ne présentent pas de différences significatives ($p > 0.05$) avec l'EAq2 et l'EAq4. Par contre, les valeurs des diamètres d'inhibition de l'EAq2 présente une différence significative avec l'EAq4 ($P < 0.05$).

Ces résultats suggèrent une meilleure efficacité pour les EAq2 et EAq3 dans le cas de *P. intermedia*.

Par ailleurs, une corrélation linéaire entre les diamètres des zones d'inhibition de la croissance des 2 germes microbiens testés et les concentrations croissantes d'extraits aqueux (EAq) des 4 plantes étudiées a été observée et résumée dans la Figure n° 55.

Le calcul du coefficient de détermination à partir des courbes de régression de l'effet des différentes concentrations des extraits de plante sur le diamètre de la zone d'inhibition des souches cliniques (figures n° 55), donne un R^2 supérieur à 0.5 pour tous les extraits végétaux étudiés à l'exception de l'effet de l'EAq1 sur le *P. gingivalis*.

Résultats et discussion

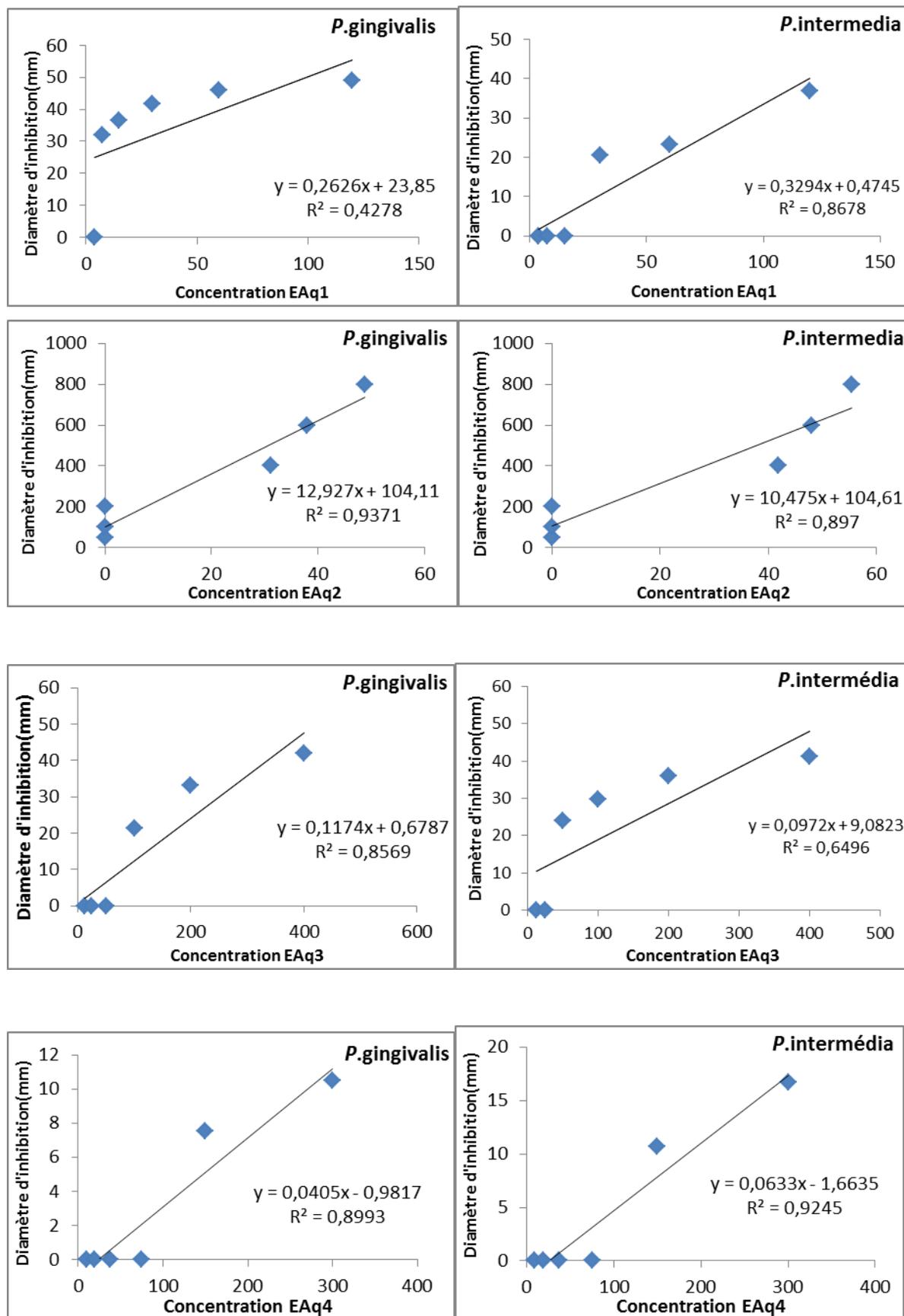


Figure n° 55 : Corrélation linéaire entre les diamètres des zones d'inhibition de la croissance des 2germes et les concentrations de l'extrait aqueux (EAQ) des plantes étudiées.

Il est à noter que la relation entre les zones d'inhibition des souches cliniques de *P. gingivalis* et les concentrations des extraits de plante était très forte et proportionnelle en particulier pour *P. gingivalis* en présence de l'EAq2 avec un $R^2 > 0.9$. Pour les autres extraits (EAq3 et EAq4) le $R^2 > 0.8$. Ces régressions sont très significative ($P < 0.01$) pour tous les extraits (EAq2, EAq3 et EAq4) avec très bonne régression ($r > 0.90$). Par contre, la relation entre le diamètre de la zone d'inhibition du *P. gingivalis* en présence de l'EAq1 est moyenne avec un $r < 0.7$, la courbe de régression est non significative ($P > 0.05$).

Quant aux souches cliniques de *P. intermedia*, la relation des zones d'inhibition de *P. intermedia* et la concentration des extraits végétaux était très forte particulièrement en présence de l'EAq4, avec un $R^2 > 0.9$. Pour les EAq1, 2 le $R^2 > 0.8$. Quant à la relation entre le diamètre des zones d'inhibition et la concentration de l'EAq3, elle s'avère moyenne avec un $R^2 > 0.6$. Dans le cas de *P. intermedia*, la régression est significative ($P < 0.05$) pour l'EAq1, 2, 4 avec un très bon coefficient de régression ($r > 0.9$). Par contre, la courbe de régression est non significative ($P > 0.05$) pour l'EAq3 avec une bonne corrélation $r = 0.8$.

L'analyse statistique des valeurs du diamètre d'inhibition de tous les extraits de plante, montre que même si tous les extraits présentent une activité antibactérienne, l'EAq1 et l'EAq2 se placent au premier rang dans l'inhibition du *P. gingivalis*, en produisant des diamètres d'inhibition les plus importants avec des valeurs qui se démarquent significativement de celles des autres extraits étudiés. En seconde place, l'EAq3 dont les valeurs des diamètres d'inhibition ne présentent aucune différence significative avec l'EAq2, se révèle également très efficace dans l'inhibition du *P. gingivalis*. L'EAq4 vient en dernière position, marquée par une résistance plus importante du *P. gingivalis*.

Dans le cas de *P. intermedia*, les EAq1, 2 et 3 apparaissent plus efficaces avec des diamètres d'inhibition importants dont les valeurs ne présentent pas de différences significatives ($P > 0.05$). Quant à l'EAq4, ce dernier se montre moins efficace dans l'inhibition de *P. intermedia*, une différence significative a été enregistrée avec l'EAq2.

La comparaison de l'efficacité de chaque extrait en fonction de sa concentration, sur chacune des souches cliniques, est représentée par un histogramme figure n° 56.

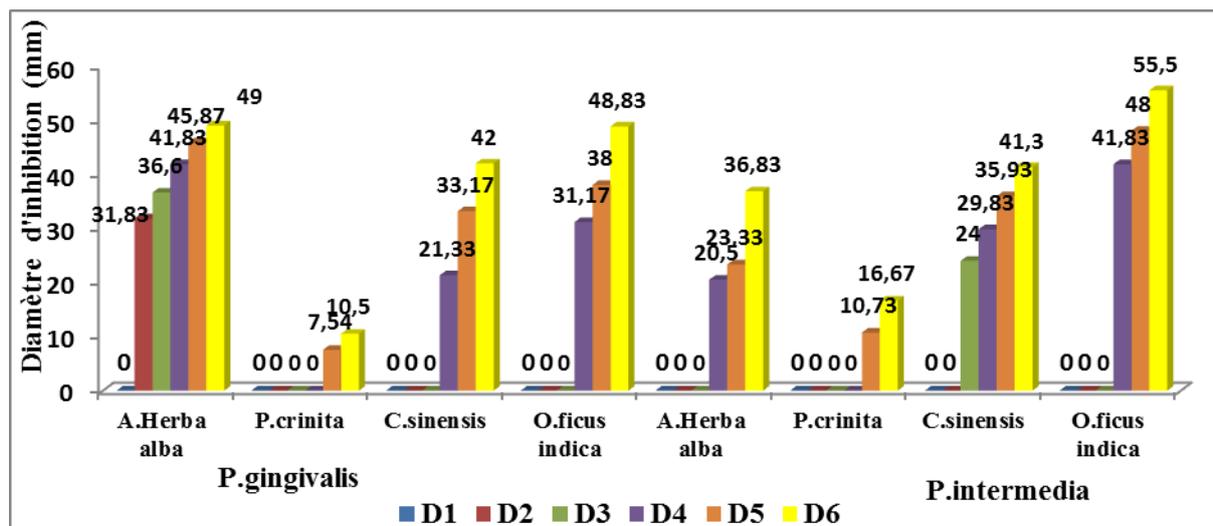


Figure n° 56 : effet des quatre extraits (EAq1, EAq2, EAq3, EAq4) sur l'inhibition de la croissance de *P. gingivalis* et *P. intermedia*.

Les CMI obtenues par la méthode de dilution en agar, sont regroupées dans le tableau n° 20. Elles permettent d'estimer la sensibilité des isolats cliniques de *P. gingivalis* et *P. intermedia* vis-à-vis des quatre extraits de plantes (EAq1, EAq2, EAq3 et EAq4) et qui sont : 0.058, 590.82, 5.49 et 0.03 mg/ml respectivement pour le *P. gingivalis*. Et 0.251, 590.82, 2.09 et 0.03 mg/ml respectivement pour *P. intermedia*.

Les résultats montrent que les souches de *P. intermedia* sont d'une manière générale plus sensibles aux extraits végétaux que le *P. gingivalis*.

Une étude comparative de différents antibiotiques et agents anti-infectieux synthétiques avec ces germes microbiens réalisée dans les mêmes conditions opératoires, est résumée dans le tableau n° 19. Ces résultats montrent que ces germes ne sont pas tous sensibles aux agents anti-infectieux synthétiques, sauf vis-à-vis de certains antibiotiques puissants et classiques.

Les résultats obtenus avec certains extraits végétaux aqueux dans cette étude, montrent que ces produits naturels sont aussi efficaces que les antibiotiques synthétiques, de plus ils possèdent l'avantage par rapport aux antibiotiques, de ne pas provoquer d'effets néfastes à long terme comme c'est le cas d'exemple du thé vert.

Discussion

L'intérêt des plantes médicinales (PM) comme sources potentielles d'agents antimicrobiens efficaces a augmenté ces dernières années. De nombreuses études, ont démontré les activités antibactériennes des extraits de plusieurs plantes.

De nombreuses PM et leurs principes actifs chimiques ont été utilisés dans la prévention et le traitement des maladies buccales (**Gultz et al., 1998; Fani et kohanteb , 2011; Fani et Kohanteb, 2012**).

Dans notre étude, les plantes utilisées sont *A. herba-alba*, *O. ficus indica*, *C. sinensis* et *P. crinita*, ces plantes ont longtemps été utilisées par la médecine traditionnelle. L'*O. ficus indica* est une plante utilisée pour ses effets anti-inflammatoires, analgésiques, hypoglycémiques, antivirales et anti-oxydantes (**Ncibi et al., 2008**).

Quant à *A. herba-alba* (Asteraceae), cette dernière pousse dans les climats arides et semi-arides. Cette plante est très utilisée en Algérie, on lui reconnaît de nombreuses vertus, par ces activités biologiques: hypoglycémiant, antibactérienne, antifongique, anti-cancer, anti-inflammatoires, neuro-protectives,...(**Olfa et al., 2015; Bora KS, Sharma A., 2011; Laouini et al., 2016**).

Le thé vert (*C. sinensis*) est une source naturelle d'agents antimicrobiens (**Sumit Bansal et al., 2013**), a quant à lui, fait l'objet de nombreuses études en raison de sa richesse en polyphénols (particulièrement les flavonoïdes comme les catéchines), sachant que toutes les activités biologiques du thé vert ont été attribuées aux catéchines (**Pham-Huy et al., 2008**). Les bienfaits de ces molécules ont été relatées par la littérature (**Pham-Huy et al., 2008 ; Derbel et Ghedira, 2005 ; Cooper et al., 2005**), pour leurs effets bénéfiques sur le cancer, les maladies cardiovasculaires, les maladies neuro-dégénératives, les pathologies buccales, etc.(**Pham-Huy et al., 2008**).

Cependant dans la plupart des études antérieures portant sur le thé vert, l'extraction des polyphénols se faisait essentiellement avec l'alcool éthylique, dans notre étude nous avons étudié l'effet bactéricide d'un extrait aqueux en vue d'une étude clinique ultérieure.

Enfin, le genre *Phlomis* appartient à la famille des Lamiacées, avec plus de 100 espèces réparties dans plusieurs continents en Europe, Asie et Afrique du Nord, plusieurs propriétés pharmacologiques lui sont attribuées. Les parties fleuries sont souvent utilisées en infusion pour traiter les troubles gastro-intestinaux. Certaines espèces ont été décrites pour protéger le foie, le rein, le cœur, les veines et les os de différentes pathologies. *P. crinita* a souvent été utilisée pour traiter les brûlures, les lésions et les infections de la peau (**Ilef Limem-Ben Amor et al., 2009; Boukef , 1986; Quezel and Santa, 1963**).

L'huile essentielle des espèces de *Phlomis* a montré une importante activité bactérienne (IlefLimem-Ben Amor et al., 2009). Il en est de même pour les extraits méthanoliques de certaines espèces de *Phlomis* (*Phlomis bruguieri*, *Phlomis herba-venti*, *Phlomis olivieri*) qui ont montré une activité bactéricides vis-à-vis de certaines bactéries (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus sanguis* et *Pseudomonas aeruginosa*) (I.L-Ben Amor et al., 2009 ; Morteza-Semnani et al., 2006).

Les flavonoïdes sont les phyto-constituants majeurs du genre *Phlomis*. La majorité des flavonoïdes isolés du genre *Phlomis* sont des flavones et flavonols. Lutéoline-7-glucoside, lutéoline-7-O - β - Glucopyranoside, chrysoeriol-7-p-coumaroyl glucoside et chrysoeriol-7-glucoside constituent les flavonoïdes glycosylés retrouvés dans le genre *Phlomis* (IlefLimem-Ben Amor et al., 2009; El-Negoumy et al., 1986; Kyriakopoulou et al., 2001; Marin et al., 2007; Javid Hussain et al., 2010).

Les extraits aqueux d'*A. herba-alba*, d'*O. ficus indica*, et de *P. crinita* ont pour la première fois fait l'objet d'une étude sur leur effet antimicrobien vis-à-vis des bactéries parodontopathogènes.

Les extraits aqueux de ces plantes (EAq1 : extrait aqueux d'*A. herba-alba*, EAq2 : extrait aqueux d'*O. ficus indica*, EAq3 : extrait aqueux de *C. sinensis* et EAq4 : extrait aqueux de *P. crinita*), ont tous présenté une activité antibactérienne variable entre eux, avec des diamètres d'inhibitions différents. Ces résultats indiquent l'existence de composés naturels antimicrobiens dans tous les extraits aqueux testés.

Le *P. gingivalis* et *P. intermedia* ont été choisis dans cette étude, car la maladie parodontale est essentiellement due à des germes anaérobies stricts Gram négatif. De plus, le *P. gingivalis* et *P. intermedia*, sont souvent retrouvés et isolés dans les poches parodontales de patients atteints de parodontite avancée (Senji Sakanaka and Yuki Okada, 2004, Palaska et al., 2013).

Le *P. gingivalis* est une bactérie hautement pathogène, qui adhère aux cellules épithéliales de l'hôte sachant que l'adhérence des bactéries aux cellules tissulaires de l'hôte est la première étape de l'infection bactérienne. Les bactéries une fois adhérentes, entament la colonisation et la production de facteurs de virulence qui endommagent les cellules de l'hôte (Gibbons, R. J., 1984; Senji Sakanaka and Yuki Okada, 2004). Selon Senji Sakanaka and Yuki Okada, 2004, le *P. gingivalis* possède plusieurs facteurs de virulences telles que la sécrétion de

produits métaboliques cytotoxiques. Ces composés pénètrent facilement dans les tissus parodontaux de l'hôte, en raison de leur faible poids moléculaire, entraînant des perturbations de l'activité de la cellule de l'hôte.

L'inhibition de la production de ces métabolites toxiques ainsi que l'inhibition de la croissance et de l'adhésion cellulaire de ces bactéries parodonto-pathogènes est très importante dans la prévention des maladies parodontales.

Ainsi, l'inhibition des facteurs de virulences du *P. gingivalis* par les polyphénols du thé vert a été rapportée de nombreuses fois par la littérature (**Sakanaka et YukiOkada, 2004**). Plusieurs études portant sur les pathologies buccales chez l'homme, montrent que le rinçage de la bouche avec du thé vert pendant 30 secondes, inhibe la croissance des bactéries responsables de la carie dentaire (**Pham-Huy et al., 2008 ; Hirasawa, M. et al., 2006 ; Cooper, R., et al., 2005 ; McKay, D.L. and Blumberg, J.B 2002 ; Gianmaria F. Ferrazzano et al., 2011**). Dans l'ensemble, les expériences sur le thé vert, ont donné des résultats prometteurs pour la santé bucco-dentaire (**Pham-Huy et al., 2008 ; Nikita Lodayekar et Chaitanya Shanbhag, 2012**).

Dans cette étude, tous les isolats de *P. gingivalis*, de *P. intermedia* y compris la souche de référence *P. gingivalis* ATCC33277, sont sensibles aux EAq1, EAq2, EAq3 et EAq4 d'*A. herba-alba*, d'*O. ficus-indica*, de *C. sinensis* et de *P. crinita* respectivement, avec des diamètres d'inhibitions différents.

Dans le cas du *P. gingivalis* les meilleurs résultats ont été attribués aux EAq1 et l'EAq 2 (*A. herba-halba* et *O. ficus indica*), en raison de leur puissante inhibition marquée par des diamètres importants, et avec des CMI de 0.058mg/ml pour le 1^{er} extrait et de 0.03mg/ml pour le 2^{ème} extrait. La sensibilité de *P. gingivalis* vis-à-vis de l'EAq1, s'est manifestée à partir de la concentration C_{PPT2} qui représente une concentration de 0.058mg/ml de PPT. Pour la concentration C_{PPT1} le germe s'est montré résistant. Quant à la sensibilité du *P. gingivalis* vis-à-vis de l'EAq2, celle-ci s'est manifestée à partir de la concentration 30 mg/ml de PPT. La bactérie étant résistante pour les doses C_{PPT1} , C_{PPT2} et C_{PPT3} .

L'activité bactéricide de l'EAq2 (*O. ficus indica*) peut être expliquée par sa composition en molécules bioactives. En effet, plusieurs auteurs attribuent les bienfaits de cette plante à ses composants notamment les polyphénols et flavonoïdes connus par leur large panel d'activités biologiques (**Gianmaria F.Ferrazzano et al., 2011**). Aujourd'hui, on reconnaît l'activité bactéricide à ces molécules, qui représentent une nouvelle source d'agents anti-infectieux (**Gianmaria F.Ferrazzano et al., 2011**).

Il en est de même pour l'armoïse (l'EAq1) qui a donné des résultats satisfaisants, en raison de sa richesse en molécules bioactives. En effet, sa richesse en polyphénols et flavonoïdes a souvent été relatée par la littérature (**Daycem Khlifi et al., 2013; Djeridane et al., 2006**).

L'EAq3 (*C. sinensis*) a prouvé son efficacité dans l'inhibition du *P. gingivalis*. Ces résultats concordent avec les publications de nombreux auteurs (**Pham-Huy et al., 2008 ; Gianmaria F. Ferrazzano et al., 2011**).

Enfin, l'EAq4 (*P. crinita*) s'est montré le moins efficace avec un diamètre d'inhibition maximal 10.50 ± 0.41 mm pour le *P. gingivalis* et 16.67 ± 1.25 mm pour *P. intermedia*. Le *P. gingivalis* apparaît moins sensible que *P. intermedia*. De plus, pour les deux germes, l'inhibition ne s'est manifestée qu'à la concentration C_{PPT5} et C_{PPT6} . Il n'y a pas eu d'inhibition pour les autres concentrations, ce qui est probablement dû à la méthode d'extraction, ou à la difficulté de l'agent antimicrobien à diffuser uniformément dans l'agar (**Athamena et al., 2010**).

L'inhibition de *P. intermedia* par l'EAq2 et 3 a été très efficace. Une très bonne régression ($r > 0.8$) pour l'EAq2 et 3 a été observée, significative ($p < 0.05$) pour l'EAq2 et non significative pour l'EAq3. Ce qui explique le lien qui existe entre la concentration de l'extrait de plante donc en PPT (polyphénols totaux) molécules bioactives responsables de l'activité bactéricide de la plante et la valeur du diamètre d'inhibition. Alors qu'avec l'EAq3 la corrélation est bonne avec une régression non significative, en dépit de son activité bactéricide toute aussi importante. Cela peut être expliqué par le caractère autant qualitatif que quantitatif des composés présents dans l'extrait, car l'efficacité d'un composé phénolique dépend de ses propriétés physicochimiques et de sa structure hétérogène, intimement lié à la méthode d'extraction (**Basli et al., 2012**).

P. intermedia s'est montré moins sensible que le *P. gingivalis* vis-à-vis de l'EAq1 et de l'EAq4. Une très bonne régression positive et très significative avec ($p < 0,01$) a été enregistrée entre le diamètre d'inhibition et les deux extraits aqueux avec un coefficient de corrélation $r > 0,93$.

Ces différences notées au cours de l'évaluation du pouvoir antibactérien des différents extraits peuvent être attribuées à plusieurs facteurs tels que la nature de l'espèce végétale et donc de ses molécules bioactives, les conditions ambiantes, les facteurs écologiques, les variations saisonnières, les méthodes d'extraction (**Bouterfas et al., 2014, ; Celiktas OY et al., 2007 ; Moreira MR et al., 2005 ; Sagdic O, Ozcan M., 2003 ; Turkmen et al., 2007**), la

préparation de l'extrait, le solvant utilisé, la sensibilité des bactéries, la concentration de l'extrait (Bouterfas et al., 2014; Loziene et al., 2007; Ulukanli Z, Akkaya A , 2011) et l'organe de la plante utilisé (Natarajan et al., 2005; Bouterfas et al., 2014).

De plus, les polyphénols sont des molécules instables, ils sont facilement oxydés par l'air et par la lumière, et par conséquent peuvent perdre toutes leurs propriétés bénéfiques pour la santé. De même, la préparation des extraits peut influencer la teneur et la disponibilité en polyphénols (Pham-Huy et al., 2008).

Pour les essais cliniques, le contrôle des niveaux de polyphénol dans les extraits de plante avant le dosage est impératif. Les études pharmacocinétiques sont également utiles pour comprendre les facteurs qui influent la biodisponibilité et le métabolisme des polyphénols et, par conséquent, leurs activités biologiques. Des essais cliniques contrôlés, sont nécessaires pour évaluer l'efficacité des polyphénols dans la chimio-prévention humaine (Pham-Huy et al., 2008).

Les résultats de l'antibiogramme illustrés par le tableau n°19 montrent que les antibiotiques les plus efficaces sont notamment les bêta-lactamines et les tétracyclines suivis de l'érythromycine et le métronidazole.

Ces résultats ont révélé l'inefficacité de certains antibiotiques notamment la Kanamycine, le Sulfaméthoxazole et le Métronidazole dans l'inhibition de la croissance de *P. gingivalis*.

La Pénicilline, l'Ampicilline/Amoxicilline, le Cefazoline, la Kanamycine, l'Erythromycine, le Sulfaméthoxazole et la Clindamycine 15UI, se sont révélés inefficaces dans l'inhibition de la croissance de *P. intermedia*.

Alors qu'à des concentrations optimales les extraits aqueux d'*A. herba-alba*, de *Camellia sinensis* et d'*O. ficus indica*, ont été très efficaces dans l'inhibition de la croissance des deux germes impliqués dans la maladie parodontale.

Ces résultats suggèrent l'utilisation de ses extraits végétaux dans la prévention des parodontites, sachant que ces produits naturels possèdent l'avantage de n'avoir aucun effet néfaste à long terme, à titre d'exemple le thé vert qui est une boisson populaire très consommée dans le monde entier.

De plus, compte tenu de l'évolution possible de bactéries buccales multi-résistantes et de l'apparition d'effets secondaires suite à l'utilisation des antibiotiques, les molécules phytochimiques naturelles isolées à partir des plantes médicinales peuvent être considérées comme alternatives dans la prévention des pathologies buccales. Beaucoup de plantes médicinales

commencent à être utilisées pour la prévention et le traitement des maladies buccales (**Fani and Kohanteb, 2012**).

5.5. Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*A. herba-alba*

Dans notre étude, l'activité antimicrobienne de l'HE et de l'extrait aqueux (EAq) de la plante *A. herba-alba* contre les germes parodonto-pathogènes, a été qualitativement et quantitativement évaluée par la mesure du diamètre d'inhibition de la croissance des germes et des valeurs de CMI.

Les résultats concernant la mise en évidence de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle (HE) et de l'extrait aqueux d'*A. herba-alba* par la méthode des disques, indique que l'HE et l'EAq de la plante présentent une très bonne activité antibactérienne vis-à-vis des souches cliniques (*P. gingivalis* et *P. intermedia*) et de la souche de référence de *P. gingivalis* ATCC 33277, avec une efficacité plus ou moins variable selon la nature de l'extrait testé, de la concentration de ce dernier et des souches testées. L'utilisation du témoin (eau distillée dans le cas de l'EAq et DMSO dans le cas de l'HE) a montré que ce dernier n'a exercé aucune activité inhibitrice, avec une poussée positive de toutes les souches cliniques y compris la souche de référence sur les disques témoins.

Les résultats des tests d'inhibition de l'activité antimicrobienne de l'HE et de l'EAq d'*A. herba-alba* sont regroupés dans le tableau n° 21. Les diamètres d'inhibition obtenus avec l'HE et l'EAq et à différentes concentrations des extraits, sont présentés par le tableau n° 21 et sont exprimés en moyenne \pm écart type de trois répétitions.

Tableau n° 21: Activité antimicrobienne de l'HE et de l'EAq d'*A. herba-alba*

	C_{EAq} (mg/ml)	C_{PPT} (mg/ml)	D.I* (mm) <i>P.ginigivalis</i> (n=20)	CMI* (mg/ml)	D.I* (mm) <i>P.intermedia</i> (n=20)	CMI* (mg/ml)
	*	*				
EAq*	D ₁ =3.75	0.028	Résistante	0.058	Résistante	0.251
	D ₂ =7.5	0.058	31.83±0.24		Résistante	
	D ₃ =15	0.119	36.60±0.43		Résistante	
	D ₄ =30	0.251	41.83±1.43		20.50±1.08	
	D ₅ =60	0.498	45.87±0.84		23.33±0.85	
	D ₆ =120	1.004	49.00±0.82		36.83±1.31	
HE	Dilutions de l'HE		D.I(mm) <i>P.ginigivalis</i> (n=20)	CMI (mg/ml)	D.I(mm) <i>P.intermedia</i> (n=20)	CMI (mg/ml)
	Huile brute (S ₀)		40,00±0.08	0,00079	34,63±0.45	0,0016
	S ₁ (d ₁ =1/2)		35.00±0,00		30±0.08	
	S ₂ (d ₂ =1/4)		27,67±0.47		24.67±0.47	
	S ₃ (d ₃ =1/8)		21.67±1.24		21.00±0.82	
	S ₄ (d ₄ =1/16)		15.00±0,00		18.33±0.47	

D.I : diamètre d'inhibition ; **d** : dilution ; C_{PPT} : concentration en polyphénols totaux ; C_{EAq} : concentration de l'extrait aqueux ; **EAq** : extrait aqueux ; **CMI** : concentration minimale inhibitrice ; **D** : dose.

Les résultats du tableau n° 21 montrent que l'EAq d'*A. herba-alba* présentent une très bonne activité antibactérienne avec des diamètres d'inhibition qui varient entre 31.83±0.24 et 49.00±0.82mm pour des concentrations en polyphénols totaux (PPT) de 0.058-1.004 mg/ml. Ces résultats témoignent d'une très bonne activité inhibitrice de la plante dans l'inhibition du germe *P. gingivalis*, sachant que pour la dose D₁=3.75mg/ml, le *P. gingivalis* s'est montré résistant.

Quant à l'huile essentielle (HE) d'*A. herba-alba*, les résultats affichent des diamètres d'inhibition qui varient entre 40,00±0.08 et 15,00±0,00mm pour des concentrations d'HE de 0,97-0.06g/ml. Notons que le diamètre d'inhibition diminue en augmentant la dilution.

Cependant, les valeurs des diamètres d'inhibition de la croissance de *P. gingivalis* obtenues avec l'EAq et l'HE de l'armoise présentent des différences non significatives ($P > 0.05$).

Les résultats obtenus avec la souche de référence *P. gingivalis* ATCC33277 pour l'EAq et l'HE de la plante, étaient similaires à ceux obtenus avec les souches cliniques de *P. gingivalis*.

Dans le cas de *P. intermedia*, les valeurs des diamètres d'inhibition obtenus varient entre 20.50 ± 1.08 et 36.83 ± 1.31 mm pour une concentration de l'extrait de plante entre 30 et 120 mg/ml de la masse végétale, ce qui correspond à une concentration entre 0.251 et 1.004 mg/ml de polyphénols totaux (PPT). On ne note aucune inhibition pour les doses D₁, D₂ et D₃. Les essais avec l'HE ont permis également d'obtenir des valeurs de diamètres d'inhibition allant de $34,63 \pm 0.45$ à 18.33 ± 0.47 mm pour des concentrations d'HE de 0,97-0.06g/ml.

Les valeurs des diamètres d'inhibition de la croissance de *P. intermedia* obtenues avec l'EAq et l'HE d'*A. herba-alba* ne présentent aucune différence significative ($P > 0.05$).

Par ailleurs, une corrélation linéaire entre les diamètres des zones d'inhibition de la croissance des 2 germes microbiens testés et les concentrations croissantes de l'EAq et de l'HE d'*A. herba-alba* a été observée et résumée dans la figure n° 57.

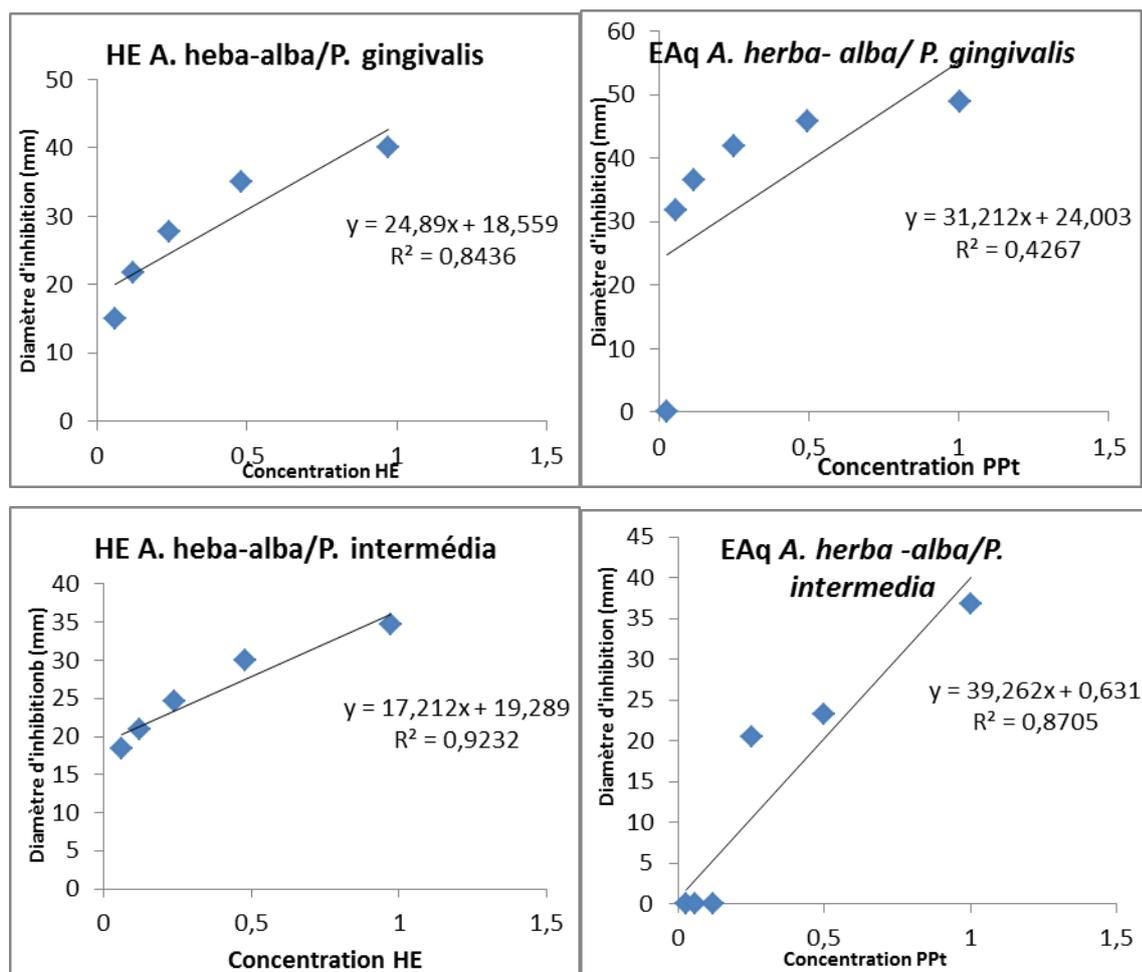


Figure n° 57 : Corrélation linéaire entre les diamètres des zones d'inhibition de la croissance des 2 germes et les concentrations de l'extrait aqueux (EAQ) et de l'huile essentielle (HE) d'*Artemisia herba-alba*.

Le calcul du coefficient de corrélation à partir des courbes de régression de l'effet des différentes concentrations de l'EAQ et de l'HE de l'armoise blanche sur la valeur du diamètre de la zone d'inhibition des souches cliniques (figure n° 57), donne un r supérieur à 0.5.

La relation entre les zones d'inhibition des souches cliniques de *P. gingivalis* et les concentrations de l'HE de la plante était très forte et proportionnelle avec un $R^2 > 0.8$. La régression entre le diamètre d'inhibition de la croissance du *P. gingivalis* et la concentration de l'HE est significative ($P < 0.05$) avec une bonne corrélation linéaire ($r = 0.92$). Par contre, la relation entre le diamètre de la zone d'inhibition du *P. gingivalis* en présence de l'EAQ de l'armoise est en dessous de la moyenne avec un $R^2 < 0.5$, avec une régression non significative ($P > 0.05$).

En ce qui concerne les souches cliniques de *P. intermedia*, la relation des valeurs des zones d'inhibition de la croissance de *P. intermedia* et la concentration de l'extrait aqueux végétal et

Résultats et discussion

de l'HE était très forte avec un $R^2 > 0.85$. De plus, dans le cas de *P. intermedia*, la régression est très significative ($P < 0.01$) aussi bien pour l'EAq que pour l'HE avec une très bonne corrélation ($r = 0.96$ dans le cas de l'HE et $r = 0.93$ dans le cas de l'extrait aqueux).

Enfin, l'analyse statistique des valeurs du diamètre d'inhibition montre que l'efficacité de l'EAq est nettement supérieure à l'efficacité de l'HE aussi bien dans le cas du germe *P. gingivalis* que *P. intermedia*. Aussi, il existe une différence significative entre les valeurs des diamètres d'inhibition de *P. gingivalis* et de *P. intermedia* avec des moyennes 34,44mm et 26,16 mm, respectivement.

D'une manière générale, l'EAq de l'armoise a donné de meilleurs résultats avec des valeurs de diamètres d'inhibition supérieurs à ceux obtenus avec l'HE. Egalement, les résultats obtenus avec *P. gingivalis* et *P. intermedia* présentaient une différence significative ($P < 0.05$), avec une sensibilité plus marquée pour le *P. gingivalis*.

La comparaison de l'efficacité de l'EAq et de l'HE d'*A. herba-alba*, sur chacune des souches cliniques, est représentée par un histogramme de la figure n° 58.

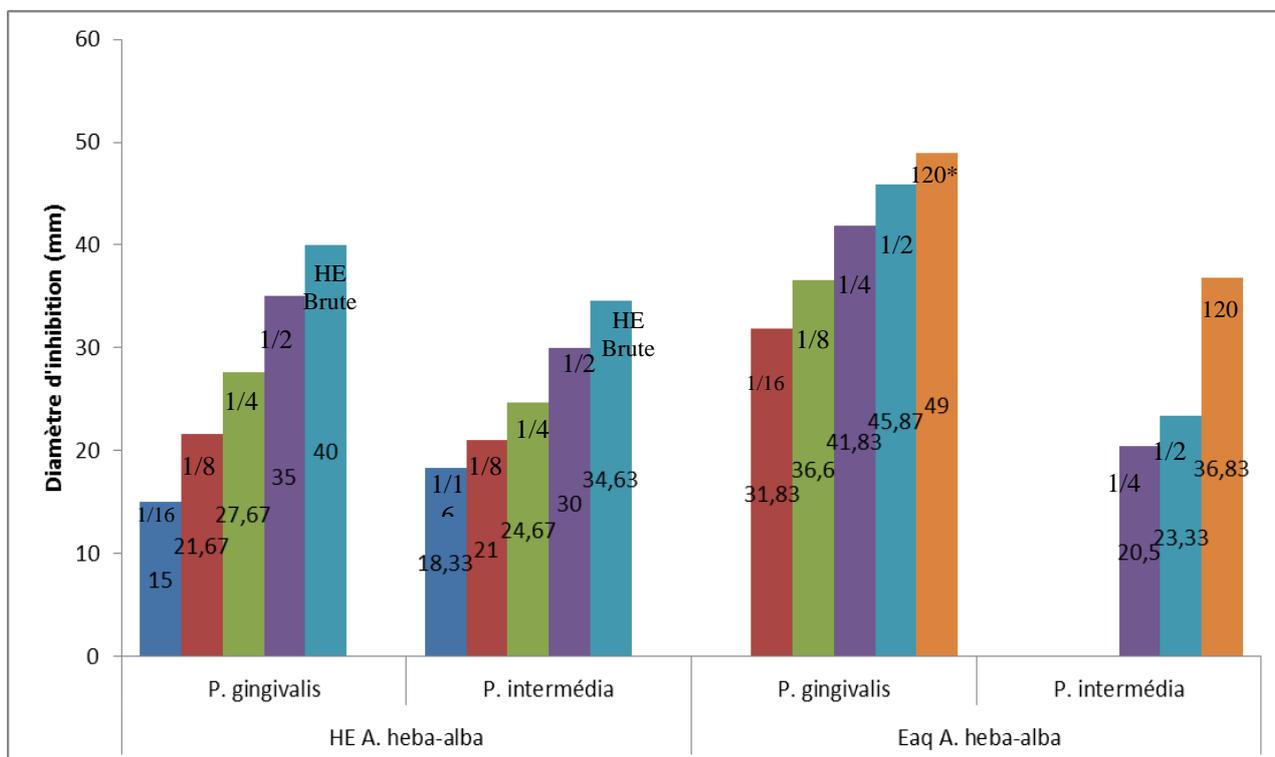


Figure n° 58 : Effet de l'EAq et de l'HE d'*A. herba-alba* sur l'inhibition de la croissance de *P. gingivalis* et *P. intermedia*.

Les CMI obtenues par la méthode de dilution en agar, sont regroupées dans le tableau n° 21. Elles permettent d'estimer la sensibilité des isolats cliniques vis-à-vis de l'EAq et de l'HE et qui sont : 0.058 et 0,00079 mg/ml respectivement dans le cas du *P. gingivalis* et 0.251 et 0,0016 mg/ml respectivement dans le cas du *P. intermedia*.

D'une manière générale, les résultats montrent que les souches de *P. gingivalis* sont plus sensibles aux extraits végétaux que celles de *P. intermedia*.

Discussion

La plante *Artemisia herba-alba* appartient à la famille des Astéracées, et comprend environ 400 espèces réparties sur les cinq continents (**Ghanmi et al., 2010**). C'est une plante médicinale et culinaire couramment consommée en Algérie. L'armoise blanche (*Artemisia herba-alba*), connue sous le nom d'absinthe du désert (en arabe : *Shih*) est une plante steppique poussant dans les terres arides ou semi-arides de l'Afrique du Nord, au Moyen-Orient ainsi qu'en Espagne (**Bezza et al., 2010**).

Cette dernière est une plante herbacée de 30–60 cm de hauteur, à tiges nombreuses et tomenteuses, très feuillues (**Ghanmi et al., 2010**).

C'est une plante largement utilisée par la médecine traditionnelle par différentes cultures et ce depuis fort longtemps, pour ses nombreuses propriétés biologiques antioxydante, analgésique, antibactérienne, antispasmodique, antidiabétique, etc. (**Messai Laid et al., 2008 ; Erdogan Orhan et al., 2010 ; Qnais et al., 2014**). D'ailleurs les extraits aqueux de l'armoise blanche ont montré des activités antileishmaniose, antigénotoxiques, antidiabétiques, antibactériennes et antispasmodiques (**Bezza et al., 2010 ; Bakkali et al., 2006 ; Hatimi et al., 2000 ; , Marrif HI., et al., 1995 ; Yashphe et al., 1987**).

Des études phytochimiques ont permis d'isoler à partir des extraits d'*A. herba-alba* divers constituants, notamment les sesquiterpènes lactones, les polyphénols, les flavonoïdes avec une large variation structurale (**Abou El-Hamd H. Mohamed et al., 2010**). Un total de huit flavonoïdes (O- et C-glycosides) ont été isolés et identifiés à partir d'*A. herba-alba* du Sinaï (**Abou El-Hamd H. Mohamed et al., 2010 ; N. A. M. Saleh et al., 1985 ; N. A. M. Saleh et al., 1987**).

Egalement, les HE de l'armoise blanche ont fait l'objet de plusieurs études au Maroc (**M. Ghanmi et al., 2010 ; Benjilali B., et al., 1982 ; Lawrence BM., 1993**), en Espagne (**M. Ghanmi et al., 2010 ; Salido S., et al., 2004**), en Tunisie (**M. Ghanmi et al., 2010 ; Akrouit A., 1999**) et en Algérie (**M. Ghanmi et al., 2010 ; Vernin G., et Merad LO., 1994 ; Vernin G., et al., 1995**). En effet, les HE de l'armoise ont été largement utilisées pour leurs propriétés antimicrobiennes (**Arzu Altunkaya et al., 2014**), antiparasitaires (**Arzu Altunkaya et al., 2014**), vermifuge (**Arzu Altunkaya et al., 2014**), antidiabétiques (**M. Ghanmi et al. ; 2010**) et hépato-protectrice (**Arzu Altunkaya et al., 2014**).

L'activité bactéricide des HE de l'armoise peut être expliquée par leurs richesses en composés oxygénés (chrysonthénone, camphre, α -terpin-7-al et trans- β -terpinéol). En effet, **Kordali et al., 2005 (M. Ghanmi et al. ; 2010 ; Kordali S., et al., 2005b ; Kordali S., et al., 2005a** ont démontré que les huiles essentielles d'*Artemisia santonicum* et *Artemisia spicigera* qui possèdent le taux le plus élevé en composés oxygénés monoterpéniques sont plus actives que celles d'*Artemisia dracunculus* et *Artemisia absinthium*. Sur la base de nombreux travaux, il peut être conclu que les huiles essentielles riches en monoterpènes oxygénés ont une activité antimicrobienne relativement plus élevée (**Arzu Altunkaya et al., 2014**).

A notre connaissance, l'extrait aqueux et l'huile essentielle d'*Artemisia herba-alba* ont pour la première fois fait l'objet d'une étude sur leur effet antimicrobien vis-à-vis des bactéries parodonto-pathogènes.

Il est à noter que dans cette étude nous avons utilisé l'eau comme solvant d'extraction, même si dans la plupart des études antérieures portant sur l'extraction des polyphénols, le solvant le plus communément utilisé est l'alcool éthylique. Ce choix est justifié par l'utilisation de cet extrait aqueux dans une étude clinique ultérieure.

Dans notre étude, l'EAq et l'HE d'*A. herba-alba* ont présenté une très bonne activité antibactérienne à l'égard des deux souches cliniques (*P. gingivalis* et *P. intermedia*) et de la souche de référence *P. gingivalis* ATCC33277.

Le *P. gingivalis* a été choisi dans cette étude car il est considéré comme un agent pathogène majeur des parodontites (**Sixou et al., 2007 ; ; Dzink JL., et al., 1985 ; Slots J., Listgarten**

MA., 1988), il en est de même pour *P. intermedia* considéré également comme un pathogène important dans la survenue des parodontites (**Sixou et al., 2007 ; Dzink JL., et al., 1985**). De plus, le *P. gingivalis* et *P. intermedia*, sont souvent retrouvés et isolés dans les poches parodontales de patients atteints de parodontite avancée (**Senji Sakanaka and Yuki Okada, 2004 ; Palaska et al., 2013**).

Cette activité bactéricide de notre HE est imputable à la fraction des monoterpènes oxygénés. En effet, les monoterpènes oxygénés comme le camphre (21.58%), l'eucalyptol ou 1,8-cinéole (9.30%), le thujone (12.96%) et le 1-terpinène-4-ol (1.55%) ont été reconnus pour leur activité antibactérienne (**Biljana Nikolic et al., 2011 ; Houda Sbayou et al., 2014 ; Arzu Altunkaya et al., 2014 ; Pattnaik S., et al., 1997**). D'une manière générale, on peut conclure que les HE riches en composés monoterpéniques oxygénés ont une activité bactéricide élevée (**Arzu Altunkaya et al., 2014**). De plus, la présence d'hydrocarbures monoterpéniques tels que le camphène (3,44%) et le α -pinène (1,41%) contribuent également à l'activité antibactérienne de notre HE. Certains auteurs rapportent que les hydrocarbures monoterpéniques et les monoterpènes oxygénés présents dans les HE, sont capables de détruire l'intégrité de la membrane cellulaire entraînant l'inhibition de la respiration et l'altération de la perméabilité (**Sami Zouari et al., 2010 ; Cox et al., 2000**).

Cependant, il est difficile d'attribuer l'activité antibactérienne d'un mélange aussi complexe que celui d'une HE à un constituant unique ou particulier. Sachant que les composés majoritaires ou minoritaires pourraient donner lieu à cette activité antimicrobienne. De plus, un possible effet synergique et antagoniste des composés dans l'HE doit également être pris en considération (**Houda Sbayou et al., 2014 ; Arzu Altunkaya et al., 2014 ; Lopez-Lutz D., et al., 2008**).

Cette efficacité des HE a été prouvée par différents travaux de recherche contre différents germes des deux groupes bactériens Gram positif et Gram négatif. Ces études ont montré que l'HE d'*A. herba- alba* riche en α et β thujones a une forte activité antibactérienne contre *B. cereus* et *S. aureus* avec une large zone d'inhibition de 22.7 ± 1.2 et 22.3 ± 1.2 mm, respectivement et une faible activité contre *E. coli* avec un diamètre de la zone d'inhibition de 12.7 ± 1.5 mm (**H. Mighri et al., 2010**).

Cependant, la plupart des études portant sur l'action des huiles essentielles contre les bactéries ont convenu que, les huiles essentielles sont un peu plus actifs contre les bactéries Gram-positives que les bactéries Gram négatif (**Sami Zouari et al., 2010 ; Lambert et al., 2001**). Dans cette étude, l'HE d'*A. herba-alba* a donné de bons résultats.

Quant à l'activité antibactérienne de l'EAq d'*Artemisia herba-alba* à l'égard des germes *P. gingivalis* et *P. intermedia*, elle est principalement attribuée à la richesse de la plante en métabolites secondaires tels que les polyphénols et les flavonoïdes (**Bezza et al., 2010 ; Salah SM. Et Jäger AK., 2005 ; Salch NAM et al., 1987**). En outre, autres investigations sur l'animal et sur l'homme reconnaissent aussi l'effet bactéricide des polyphénols (**Gianmaria F. Ferrazzano et al., 2011 ; Luczaj W., et Skrzydlewska E., 2005 ; Milgrom, P., et al., 2000**).

Des travaux antérieurs ont permis d'identifier chez l'espèce *Artemisia herba-alba* une diversité structurale allant des flavonoïdes communs, tels que les flavones glycosides et les flavonols, jusqu'aux flavonoïdes méthylés qui sont rarement étudiés (**S. Ghazi et al., 2015 ; Saleh NAM et al., 1987 ; Salah SM et Jager AK., 2005**).

Ces flavonoïdes présentent un effet protecteur pour les plantes (**S. Ghazi et al., 2015 ; Treutter D., 2005**). De plus, ces biomolécules ont fait l'objet de plusieurs études en raison de leurs nombreuses activités antibactériennes (**Cushnie T.P.T et Lamb A.J., 2005 ; Havsteen B., 1983 ; Harborne JB, Baxter H., 1999**), anti-inflammatoires (**Cushnie T.P.T et Lamb A.J., 2005 ; Ghazi et al., 2015 ; Bellakhdar J. et al., 1983 ; Pierini R. et al., 2008**), anti-oxydantes (**Cushnie T.P.T et Lamb A.J., 2005 ; Middleton Jr E. et Chithan K., 1986**). L'activité antibactérienne des extraits de plantes riches en flavonoïdes a été relatée par la littérature scientifique (**Cushnie T.P.T et Lamb A.J., 2005**). Ainsi, ces polyphénols et flavonoïdes seraient à l'origine de l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux d'*A. herba-alba*.

Cependant, on note que l'extrait aqueux d'*A. herba-alba* a donné de meilleurs résultats que l'huile essentielle de cette plante. Cette différence notée au cours de l'évaluation du pouvoir antibactérien de l'EAq et de l'HE peut être due à certains facteurs, en effet, la nature hydrophobe de l'huile essentielle, pourrait empêcher la diffusion uniforme à travers le milieu de gélose des composants de cette dernière (**Altunkaya A. et al., 2014**). Aussi, l'utilisation du

DMSO comme agent émulsifiant permet d'assurer le contact entre le micro-organisme et l'agent antimicrobien (Altunkaya A. et al., 2014 ; Hili P. et al., 1997).

De plus, la nature de la membrane externe des bactéries à Gram-négatif, composée de lipopolysaccharides, lesquels pourraient entraver la diffusion de l'HE à l'intérieur de la cellule en raison de son caractère hydrophobe (Sbayou Houda et al., 2014 ; C.M. Mann et al., 2000 ; C.J. Longbottom et al., 2004).

Les résultats de cette étude sont très encourageants. En effet, aussi bien l'extrait aqueux que l'huile essentielle d'*Artemisia herba-alba* ont manifesté une très bonne activité antibactérienne à l'égard de *Porphyromonas gingivalis* et de *Prevotella intermedia* tous deux considérés comme des pathogènes importants dans la survenue des parodontites (Sixou et al., 2007 ; Dzink JL., et al., 1985 ; Slots J., Listgarten MA., 1988).

Une étude comparative avec quelques antibiotiques montrent que ces extraits végétaux étudiés sont aussi puissants que ces agents synthétiques sur le germe *Porphyromonas gingivalis*, mais un peu plus forts que ces médicaments sur le germe *Prevotella intermedia*. Par contre, ces produits naturels sont peu toxiques ou non toxiques, et peuvent être utilisés à long terme.

Ces extraits de plante pourraient représenter une voie alternative et innovante de médicaments naturels antibactériens, à même de remplacer les médicaments actuellement proposés souvent inefficaces et avec des effets secondaires non négligeables sur la santé. Ces biomolécules naturelles avec peu ou pas d'effets secondaires, pourraient constituer une nouvelle classe d'agents antibactériens pour le traitement des parodontites.

La large utilisation des antibiotiques a conduit à l'émergence de bactéries résistantes (Filippo Fratini et al., 2014 ; Zafalon LF et al., 2007) et a augmenté la quantité de résidus d'antibiotiques dans notre alimentation (Filippo Fratini et al., 2014 ; Fagundes H et al., 2010), ce qui justifie l'étude de traitements alternatifs, représentés par l'utilisation de composés naturels dérivés de plantes ou d'extraits comme les huiles essentielles (Filippo Fratini et al., 2014 ; Baskaran SA et al., 2009; Dal Pozzo M et al., 2011).

Des travaux supplémentaires sont nécessaires pour une meilleure utilisation de ces ressources naturelles. Selon de récentes études, les composants de certaines plantes peuvent agir comme des inhibiteurs de la résistance des bactéries aux antibiotiques.

Ainsi, la combinaison d'un extrait végétal avec un traitement d'antibiotique en vue de trouver un système pouvant améliorer l'efficacité des antibiotiques utilisés et surtout d'inhiber la résistance bactérienne, pourrai faire l'objet d'un nouveau axe de recherche. D'ailleurs, des résultats préliminaires ont montré que des extraits de plantes ont présenté un effet inhibiteur de la résistance des bactéries aux antibiotiques avec différent niveau d'efficacité en fonction de la souche étudiée (**Abou El-Hamd H. Mohamed et al., 2010**). L'*A. herba-alba* a présenté des effets inhibiteurs sur la souche résistante et la souche standard de *S. aureus* (**Abou El-Hamd H. Mohamed et al., 2010 ; R. M. Darwish et al., 2002**).

Sachant que les composants des extraits aqueux ou des HE des plantes sont des molécules dans la plupart des cas bioactives, l'étude de l'activité antibactérienne de ces molécules seules ou mélangées permettrait d'augmenter l'activité bactéricide et de mieux comprendre l'effet synergique ou antagoniste de ces molécules.

Bien sûr une étude clinique est envisagée en vue de confirmer l'efficacité de ces extraits dans le traitement et la prévention des maladies parodontales.

Conclusion

La caractérisation physico-chimique des plantes algériennes (*A. herba-alba*, *O. ficus-indica* et *Phlomis crinita*) et la plante du thé vert (*Camellia sinensis*) révèle une importance et une urgence dans la valorisation et l'exploitation industrielle de ces produits en vue d'extraire leurs molécules bioactives. En plus des polyphénols totaux, les minéraux (1.35-13.51%), la matière organique (86.49-98.65%) leur confèrent des propriétés importantes pour leur utilisation comme plantes fourragères et alimentaires.

L'extraction des huiles essentielles d'*A. herba-alba* par hydrodistillation a donné un produit de bonne qualité avec un aspect liquide, une couleur jaune et une odeur forte semblable à l'odeur originelle de l'armoise. Ces propriétés physicochimiques montrent que cette huile a un indice de réfraction de $1.4443 \pm 0,0015$, un indice d'acide de $0,5611 \pm 0,0$, un indice d'ester de $9.6610 \pm 0,66$, une densité relative de $0.9700 \pm 0,0$, un pH de 5,6 et un point de congélation de -20.

Le rendement d'extraction par hydrodistillation est de $0,84 \pm 0,0\%$. Ce dernier dépend de la quantité du matériel végétal et du taux d'humidité. Il est donc nécessaire et important de réaliser l'extraction des huiles essentielles avant le séchage de la plante.

La composition chimique de l'HE, des deux plantes *A. herba-alba* provenant des deux régions de Biskra et Bousâada, effectuée par GC/MS a révélé la prédominance de 17 composés principaux qui sont : Camphre (21.58%), thujone (12.96%), Eucalyptol (9.30%), 1,6-Dimethylhepta-1,3,5-triene (9.07%), 1,2,5,5-tetra methyl- (5.28%), β -thujone (4.32%), 1,2-Pentadiene (3.53 %), camphene (3.44%), Limoneneoxide, cis- (3.16%), borneol (1.71%), (1,3-Dimethyl-2-methylene-cyclopentyl)-methanol (1.30%), (-)-terpinen-4-ol (1.55%), alpha-Pinene (1.41%), m-cymene (1.37%), beta-myrcene (1.24%), (E)p-2-menthen-1-ol (1.10%) et 1 H-Pyrrole-2- carboxylicacid (1.08%) pour l'armoise de Biskra. Quant à l'armoise de Bousâada, son huile est possèdent 10 éléments dominants tels que : Camphre (26.11%), .alpha thujone (22.67%), thujone (12.57%), eucalyptol (10.31%) chrysanthenone (7.55%), beta thujone (3.49%), et d'autres composants avec des teneurs moins importantes comme le camphene (2.72%), borneol L (1.64%), borneol (1.54%) et pinocarvone (1.08%).

L'identification des souches cliniques isolées à partir des patients atteints de la maladie parodontale a été réalisée par :

- La coloration de Gram d'un prélèvement intra-sulculaire des sillons sains, a montré la dominance des cocci à Gram positif et négatif qui représentent probablement le genre *Streptococcus* anaérobies facultatifs et *Neisseria* aérobies anaérobies facultatifs. Alors que, la flore d'une poche parodontale est riche en cocci, en cocobacilles et en bacilles à Gram négatifs.
- Les galeries Api 20 A montrent l'existence de deux types de bactéries. Des souches qui sont asaccharolytiques, indolgènes, ne dégradent pas l'esculine. Elles sont inhibées par: Pénicilline, ampicilline, ticarcilline, cefazoline, cefoxitine, cefotaxime, piperacilline, imipenem, tetracycline et metronidazole. Par contre, elles résistent aux: kanamycine, erythromycine, clindamycine, vancomycine et sulfametoazole. C'est la souche *Porphyromonasasaccharolytica*.
D'autres souches sont saccharolytiques, inhibées par: Ticarcilline, cefoxitine, cefotaxime, imipenem, amox+ ac. Clavulnique, tetracycline et metronidazole. Cependant, elles résistent aux: Pénicilline, ampicilline, cefazoline, kanamycine, erythromycine, clindamycine, vancomycine et sulfametoazole. C'est la souche de *Prevotellaintermedia*.
- L'identification des souches cliniques *P. asaccharolytica* par la technique de PCR a montré que cette dernière appartient à l'espèce *P. gingivalis* en comparant les gènes amplifiés de la souche *P. gingivalis* ATCC 33277.
- L'identification par la technique MALDI-TOF /MS a confirmé la présence des souches de *P. gingivalis* avec des valeurs de score (1.751-1.982) et des souches de *P. intermedia*, avec des valeurs de score allant de 1.826 à 2.104.
- L'identification des souches de *P. intermedia* a été confirmée par la technique de séquençage de l'ARN 16S.

L'étude de l'activité antibactérienne des extraits aqueux des différentes plantes indiquent que tous les extraits présentent une activité antibactérienne vis-à-vis des souches cliniques (*P. gingivalis* et *P. intermedia*) et de la souche de référence de *P. gingivalis* ATCC 33277, avec une efficacité plus ou moins variable selon la nature de l'extrait testé, de la concentration de ce dernier et des souches testées.

- L'EAq1 d'*A. herba-helba* présente des diamètres d'inhibition du *P. gingivalis* qui varient entre 31.83 ± 0.24 mm et 49.00 ± 0.82 mm pour des concentrations en PPT de 0.058-1.004 mg/ml,
- L'EAq2 d'*O. ficus indica*, exhibe des diamètres d'inhibition vis-à-vis du *P. gingivalis*, qui varient entre 31.17 ± 0.85 mm et 48.83 ± 1.03 mm, pour des concentrations en PPT de 30-135,26 mg/ml.
- L'EAq3 de *C. sinensis* montre des zones d'inhibition à l'égard de *P. gingivalis*, dont les diamètres se situent entre 21.33 ± 2.62 mm et $42.00 \pm 0,41$ mm pour des concentrations en PPT de 5.49-20,27mg/ml.
- L'EAq4 de *P. crinita* donné des diamètres d'inhibition allant de 07.54 ± 0.36 à 10.50 ± 0.41 mm dans l'inhibition de *P. gingivalis*.
- L'analyse statistique des valeurs du diamètre d'inhibition de tous les extraits de plante, montre l'EAq1 et l'EAq2 se placent au premier rang dans l'inhibition du *P. gingivalis*. En seconde place, l'EAq3 se révèle également très efficace dans l'inhibition du *P. gingivalis*. L'EAq4 vient en dernière position, marquée par une résistance plus importante du *P. gingivalis*. Les tests statistiques indiquent clairement qu'il n'existe pas de différence significative entre l'EAq1 et l'EAq2 ($P > 0.05$), de même entre l'extrait aqueux de *P. crinita* (EAq4) et l'EAq3 ($P > 0.05$). En revanche il y a une différence significative entre l'EAq1 et les deux extraits aqueux de *P. crinita* (EAq4) et l'EAq3 ($P < 0.05$), mais on ne note pas de différence significative pour ces deux extrait avec les résultats obtenu avec l'EAq2 ($P > 0.05$).
- Les résultats obtenus avec la souche de référence *P. gingivalis* ATCC33277 pour tous les extraits, étaient similaires à ceux obtenus avec les souches cliniques de *P. gingivalis*.
- En ce qui concerne le germe *P. intermedia*, les valeurs des diamètres d'inhibition obtenus avec l'EAq1 ne présentent pas de différence significative aussi bien avec l'EAq2, l'EAq3

que l'EAq4 ($P > 0.05$). Il en est de même, pour l'EAq 3 dont les valeurs des diamètres d'inhibitions ne présentent pas de différences significatives ($p > 0.05$) avec l'EAq 2 et l'EAq 4. Par contre, les valeurs des diamètres d'inhibition de l'EAq2 présente une différence significative avec l'EAq 4 ($P < 0.05$).

- Ces résultats suggèrent une meilleure efficacité pour les EAq2 et EAq3 dans le cas de *P. intermedia*.
- Une corrélation linéaire entre les diamètres des zones d'inhibition de la croissance des 2 germes microbiens testés et les concentrations croissantes d'extraits aqueux (EAq) des 4 plantes étudiées a été observée
- Le calcul du coefficient de détermination à partir des courbes de régression de l'effet des différentes concentrations des extraits de plante sur le diamètre de la zone d'inhibition des souches cliniques, donne un R^2 supérieur à 0.5 pour tous les extraits végétaux étudiés à l'exception de l'effet de l'EAq1 sur le *P. gingivalis*.
- Les HE extraites à partir la plante *A. herba-alba* sont dotées d'un pouvoir antibactérien à l'égard des souches *P. gingivalis* et *P. intermedia* avec des valeurs de CMI de 0,00079 mg/ml et 0.0016 mg/ml, respectivement.
Les valeurs des diamètres d'inhibition de la croissance de *P. gingivalis* obtenues avec l'EAq et l'HE de l'armoise présentent des différences non significatives ($P > 0.05$). Pour la bactérie *P. intermedia*, la régression est très significative ($P < 0.01$) aussi bien pour l'EAq que pour l'HE avec une très bonne corrélation ($r=0.96$).
- D'une manière générale, les résultats montrent que les souches de *P. gingivalis* sont plus sensibles aux extraits végétaux que celles de *P. intermedia*.

Les Perspectives de ces travaux concernant l'exploitation des plantes dans le traitement et la prévention des maladies parodontales sont nombreuses. D'autres investigations, tant sur le plan technique d'extraction que sur le plan microbiologique et clinique seront encore nécessaires. Ainsi, en perspective il serait intéressant :

- D'améliorer le rendement d'extraction des huiles essentielles en utilisant d'autres techniques plus performantes et rentables, permettant de réduire la quantité d'eau, l'énergie et le temps consommés pour un meilleur respect de l'environnement, pour cela :

- L'extraction par l'eau chaude pressurisée ou eau sub-critique pourrait également être utilisée pour extraire les PPT.
 - De même, l'extraction sans solvant, par la technique MHG (Microwave Hydrodiffusion and Gravity) pourrait constituer l'approche la plus respectueuse de l'environnement afin d'extraire les molécules bioactives (HE, PPT...).
 - Également l'utilisation des solvants verts pour l'extraction des PPT pourrait être intéressante.
-
- De préparer un film microbien à partir des poches parodontales et en vue d'étudier l'activité antibactérienne in vitro et de prouver l'efficacité réelle des extraits aqueux et des HE à l'égard de ce film.
 - D'élargir la gamme des microorganismes prélevés par l'étude des bactéries du complexe rouge.
 - D'isoler les différentes molécules qui constituent les extraits végétaux pour cibler lequel des composants est doté du pouvoir antibactérien.
 - De proposer les extraits aqueux comme bains de bouche, dans une étude clinique sur des volontaires atteints de la maladie parodontale.

Références

BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- **Abdel-Hameed El-Sayed S., Mohamed A. Nagaty, Mahmood S. Salman, Salih A. Bazaid.** Phytochemicals, nutritionals and antioxidant properties of two prickly pear cactus cultivars (*Opuntia ficus indica* Mill.) growing in Taif, KSA. *Food Chemistry* 160 (2014) 31–38.
- 2- **Abou El-Hamd H. Mohamed, Magdi. A. El-Sayed, Mohamed E. Hegazy, Soleiman E. Helaly, Abeer M. Esmail and Naglaa S. Mohamed.** Chemical Constituents and Biological Activities of *Artemisia herba-alba*. *Rec. Nat. Prod.* 41 (2010) 1-25.
- 3- **Acharya Aneesha, Chan Yuki, Kheur Supriya , Jin Li Jian, Watt Rory M. , Mattheos Nikos.** Salivary microbiome in non-oral disease: A summary of evidence and commentary. *Archives of Oral Biology* 83 (2017) 169-173.
- 4- **Adida H., Benariba N., Bechiri A., Chekroun E., Djaziri R.** Étude phytochimique et évaluation du pouvoir antiradicalaire des extraits de *Pituranthos scoparius*. *Phytothérapie*, 14 (2016) 207-212.
- 5- **Adli B., Boutekrabt A., Touati M., Bakria T., Touati A., Bezini E.** Phenotypic diversity of *Opuntia ficus indica* (L.) MILL. in the Algerian steppe. *South African Journal of Botany* 109 (2017) 66-74.
- 6- **Afanasev M. V., Mironova L. V., Basov E. A., Ostyak A. S. , Kulikalova E. S., Urbanovich L. Ya., and S. Balahonov S. V.** MALDI–TOF Mass Spectrometry in the Accelerated Identification of Microorganisms of the *Vibrio* Genus. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, (2014) Vol. 29, No. 3, pp. 115–122.
- 7- **AFNOR, 1988** (Association Française de Normalization). Contrôle de la qualité des céréales
- 8- **AFNOR, 1989**(Association Française de normalization).
- 9- **AFNOR, 1988** (Association Française de normalization). Corps gras, graines
- 10- **AFNOR, 1982.** Céréales et produits céréaliers. Recueil des normes françaises éditées par AFNOR.
- 11- **Aguirre Joya Jorge, De La Garza Toledo Heliodoro, Zugasti Cruz Alejandro, Belmares Cerda Ruth, Aguilar Cristobal Noé.** The optimization of phenolic compounds extraction from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) skin in a reflux system using response surface methodology. *Asian Pac J Trop Biomed*; 3 (6) (2013) 436-442.
- 12- **Ahn Sun Hee, · Ji-Eun Song, · Suhee Kim, · Sung-Hyun Cho, · Yun Kyong Lim; · Joong-Ki Kook, · Min-Suk Kook, · Tae-Hoon Lee.** NOX1/2 activation in human gingival fibroblasts by *Fusobacterium nucleatum* facilitates attachment of *Porphyromonas gingivalis*. *Arch Microbiol*, (2016) DOI 10.1007/s00203-016-1223-7.

13-**Alauzet Corentine (2009)**. Taxonomie des bactéries anaérobies: De la reclassification à la découverte de nouveaux pathogènes. Thèse de doctorat. Université Henri Poincare.

14-**Albaladejo Rafael G., Javier Fuertes Aguilar, Abelardo Aparicio¹ and Gonzalo Nieto Feliner**. Contrasting nuclear-plastidial phylogenetic patterns in the recently diverged Iberian *Phlomis crinita* and *P. lychnitis* lineages (Lamiaceae). *Taxon* 54 (4) (2005) 987–998.

15-**Ali-Delille Lucienne (2010)**. Les plantes médicinales d'Algérie. Editions Berti.

16-**Alimi Hichem, Najla Hfaeidha, Zouhour Bouonia, Mohsen Saklyb, Khémais Ben Rhouma**. Ameliorative effect of *Opuntia ficus indica* juice on ethanol-induced oxidative stress in rat erythrocytes. *Experimental and Toxicologic Pathology* 65 (2013) 391–396.

17- **Altunkaya Arzu, Bünyamin Yıldırım, Kamil Ekici, Ömer Terzioglu**. Determining essential oil composition, antibacterial and antioxidant activity of water wormwood extracts *gida* (2014) 39 (1): 17-24.

18-**Amarti F., M. El Ajjouri, M. Ghanmi, B. Satrani, A. Aafi¹, A. Farah, A. Khia¹, A. Guedira, M. Rahouti, A. Chaouch**. Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle de *Thymus zygis* du Maroc. *Phytothérapie* 9 (2011) 149–157 © Springer-Verlag France.

19-**Araghizadeh A, Kohanteb J, Fani MM**. Inhibitory activity of green tea (*Camellia sinensis*) extract on some clinically isolated cariogenic and periodontopathic bacteria. *Med Princ Pract.*; 22 (4) (2013) 368-72.

20-**Arba M**. Le cactus *Opuntia*, une espèce fruitière et fourragère pour une agriculture durable au Maroc. Symposium international « Agriculture durable en région méditerranéenne (AGDUMED) », Rabat, Maroc, 14-16 mai (2009).

21-**Archana S. and Jayanthi Abraham**. Comparative analysis of antimicrobial activity of leaf extracts from fresh green tea, commercial green tea and black tea on pathogens. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 01 (08) (2011) 149-152.

22- **Athamena S., I. Chalghem¹, A. Kassah-Laouar ², S. Laroui ³ et S. Khebri**. Activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum Cuminum L.* *Lebanese Science Journal*, Vol. 11, No. 1, (2010).

- 23- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, et al.** Antigenotoxic effects of three essential oils in diploid yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) after treatment with UVC radiation, 8-MOP plus UVA and MMS. *Mut Res* 606(1–2) (2006) 27–38
- 24- Bakour M, Al-Waili N, El-Haskoury R, El-Menyiy N, Al-Waili T, AL-Waili A, Lyoussi B,** Comparison of hypotensive, diuretic and renal effects between cladodes of *Opuntia ficus indica* and furosemide, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* (2017), doi: 10.1016/j.apjtm.2017.08.016.
- 25- Baskaran SA, Kazmer GW, Hinckley L, Andrew SM, Venkitanarayanan K.** Antibacterial effect of plant-derived antimicrobials on major bacterial mastitis pathogens in vitro. *J Dairy Sci* (2009) ; 92:1423–9. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2008-1384>.
- 26-Basli A., Chibane M., Madani K., Oukil N.** Activité antibactérienne des polyphénols extraits d'une plante médicinale de la flore d'Algérie : *Origanum glandulosum* Desf. *Phytothérapie* (2012) 10:2–9.
- 27-Bekhechi Chahrazed et Abdelouahid Djamel Eddine.** Les huiles essentielles ; Edition 1.04.5145 (2010); p10;35;36.
- 28-Bekhechi VA, Atik-Bekkara F., Abdelouahid D. E.** Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* d'Algérie. *Phytothérapie*, 6 (2008) 153–159
- 29-Belhattab Rachid, Amor Loubna, Barroso José G., Pedro Luis G., Figueiredo A. Cristina.** Essential oil from *Artemisia herba-alba* Asso grown wild in Algeria: Variability assessment and comparison with an updated literature survey. Volume 7, Issue 2, (2014) Pages 243-251.
- 30- Bellakhdar J, Honda G, Miki W (1983)** Herbs drugs and herba lists in the Maghreb, Éd techniques nord-africaines, Institute for study of language and culture. Tokyo.
- 31- Ben Amor Ilef Limem, Aicha Neffati, Mohamed Ben Sgaier, Wissem Bhour, Jihed Boubaker, Ines Skandrani, Ines Bouhlel, Soumaya Kilani, Rebai Ben Ammar, Imed Chraief, Mohamed Hammami, Mohamed Ghoul, Leila Chekir-Ghedira, Kamel Ghedira.** Antimicrobial Activity of Essential Oils Isolated from *Phlomis crinita* Cav. ssp. mauritanica Munby. *J Am Oil Chem Soc* 85 (2008) 845–849.

- 32- **Ben Amora Ilef Limem ,b, Jihed Boubakera,b, Mohamed Ben Sgaier a,b, Ines Skandrania,b, Wissem Bhouria,b, Aicha Neffati a,b, Soumaya Kilani a,b, Ines Bouhlela,b, Kamel Ghediraa,b, Leila Chekir-Ghedira.** Phytochemistry and biological activities of *Phlomis* species. *Journal of Ethnopharmacology* 125 (2009) 183–202.
- 33-**Bencheqroun H. K., Ghanmi M., Satrani B., Aafi A. et Chaouch A.** Activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Artemisia mesatlantica*, plante endémique du Maroc. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, Vol. 81 (2012) p. 4 – 21.
- 34-**Benjilali B, Sarris J, Richard H.** Nouveaux chémotypes d'*Artemisia herba-alba*. *Sci Aliment* 2 (1982) 515–27.
- 35-**Benkherara S., Bordjiba O., Djahra A. B.** Évaluation in vitro de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Salvia officinalis*. *Phytothérapie* 13 (2015) 14-18.
- 36-**Bezza L., Mannarino A., Fattarsi K., Mikail C., Abou L., Hadji-inaglou F., Kaloustian J.** Chemical composition of the essential oil of *Artemisia herba-alba* issued from the district of Biskra (Algeria). *Phytothérapie*. Volume 8, Issue 5 (2010) pp 277–281.
- 37-**Bertrand D. et Dufour E. (2006).** La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques. Editions TEC et DOC. Lavoisier. Paris.
- 38-**Billerbeck G.** Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. *Phytothérapie*, 5 (2007) 249–253.
- 39- **Bodet Charles (2007).** Modulation de la réponse inflammatoire de l'hôte par les bactéries parodontopathogènes : Mécanisme de pathogénicité et cible thérapeutique potentielle. Thèse pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.). Département de biochimie et de microbiologie. Faculté des sciences et de génie université Laval Québec.
- 40-**Boizot Nathalie et Charpentier Jean-Paul.** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier des Techniques de l'Inra*. Numéro spécial 2006.
- 41- **Bora KS, Sharma A.** Evaluation of antioxidant and free radical scavenging potential of *Artemisia absinthium*. *Pharmaceutical Biology*; 49 (2011) 1216–1223.

- 42-**Borsanelli Ana C., Gaetti-Jardim Jr., Schweitzer Christiane M., Viora Lorenzo, Busind Valentina, Riggioe Marcello P., Dutraa Iveraldo S.** Black-pigmented anaerobic bacteria associated with ovine periodontitis. *Veterinary Microbiology* 203 (2017) 271-274.
- 43-**Bouaoun D., Hilan C., Garabeth F., Sfeir R.** Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'une plante sauvage *Prangos asperula* Boiss. *Phytothérapie* ; 5 (2007) 129–134.
- 44- **Boukef, M.K., (1986).** Les plantes dans la médecine traditionnelle tunisienne. Ed. Agence de Cooperation Culturelle et Technique, Paris.
- 45-**Boukhatem M. N., Hamaidi M. S., Saidi F., Hakim Y.** Extraction, composition et propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle du Géranium Rosat (*Pelargonium graveolens* L.) cultivé dans la plaine de Mitidja (Algérie). *Revue « Nature et Technologie »*. n° 03/Juin (2010) Pages 37 à 45.
- 46- **Bourgou Soumaya, Bettaieb Iness, Mkadmini Khawla, Isoda Hiroko, Ksouri Riadh , Megdiche Ksouri Wided.** LC-ESI-TOF-MS and GC-MS profiling of *Artemisia herba-alba* and evaluation of its bioactive properties, *Food Research International*, doi:10.1016/j.foodres (2017) 06.009
- 47- **Boussaber Elarbi , Sidi Brahim Salem El Idrissi, Issam Meftah Kadmiri, Lahoucine Hilali, and Abderraouf Hilali.** Une approche d'identification moléculaire des souches d'actinomycètes productrices d'activités antimicrobiennes par séquençage de l'ADNr 16S. *International Journal of Innovation and Applied Studies* Vol. 3 No. 4 Aug. (2013), pp. 1053-1065.
- 48- **Bouterfas K., Mehdadi Z., Latreche A., Aouad L.** Pouvoir antimicrobien des flavonoïdes extraits des feuilles de *Marrubium vulgare* L. en provenance du mont de Tessala (Algérie occidental. *Phytothérapie*, 12 (2014) 6-14.
- 49-**A Bouyahya, J. Abrini, Y. Bakri, N. Dakka.** Les huiles essentielles comme agents anticancéreux : actualité sur le mode d'action. *Phytothérapie*, (2016) DOI 10.1007/s10298-016-1058-z.
- 50-**Bouzidi Nebia. (2016).** Etude des activités biologiques de l'huile essentielle de l'armoise blanche «*Artemisia herba alba* Asso». Thèse de Doctorat .Université Mustapha Stambouli de Mascara.

51- Cariello Cristina (2012). La Spectrométrie de masse MALDI-TOF et le diagnostic microbiologique. Travail de diplôme. ICHV, Laboratoire de microbiologie, Sion.

52-Celiktas OY, Hames Kocabas EE, Bedir E, et al. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis* L., depending on location and seasonal variations. *Food Chem* 100 (2007) 553–9.

53-Cermelli, C., Fabio, A., Fabio, G., Quaglio, P. Effects of eucalyptus essential oil on respiratory bacteria and viruses. *Curr. Microbiol.* 56 (2008) 89–92.

54-Chardin H., Barsotti O. et Bonnaure-Mallet M. (2006). Microbiologie odontostomatologie. Edition Maloine, Paris.

55-Charon Jacques et Mouton Christian (2003). Parodontie médicale. Editions CdP. Collection JPIO.

56-Chouguia Nadia, Abderezak Tamendjaria, Wahiba Hamidja, Salima Hallala, Alexandre Barrasb, Tristan Richardb, Romain Larnat. Oil composition and characterisation of phenolic compounds of *Opuntia ficus-indica* seeds. *Food Chemistry* 139 (2013) 796–803.

57- Collin Sonia et Crouzet Jean (2011). Polyphénols et procédés. Editions TEC et DOC.

58-Cooper Raymond, Ph.D., D. James Morr , Ph.D., and Dorothy M. Morr , Ph.D. Medicinal Benefits of Green Tea: Part I. Review of Noncancer Health Benefits. *The journal of Alternative and complementary medicine.* Volume 11, Number 3 (2005) pp. 521–528.

59- Corsan Myriam (2008). Ne plus confondre : *Opuntia* et *Opuntia*.... *Opuntia ficus-indica* (Linnaeus) Miller , *Opuntia stricta* (Haworth) Haworth.

60-Cox SD., Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warmington JR and Wyllie SG. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J. Appl. Microbiol.* 88 (2000) 170–175.

61-Cushnie T.P.T et Lamb A.J. *International Journal of Antimicrobial Agents* 26 (2005) 343–356.

62- Dahlen G. Bacterial infections of the oral mucosa. *Peridontology* 2000, Vol. 49 (2009) 13-38.

- 63-**Dahmani-Hamzaoui N. & Baaliouamer A.** Chemical composition of Algerian *Artemisia herba-alba* essential oils isolated by microwave and hydrodistillation. *J. Essential Oil Res.*, 22, 6 (2010) 514-517.
- 64-**Darwish R. M., Aburjai T., Al-Khalil S. and Mahafzah A.** Screening of antibiotic resistant inhibitors from local plant materials against two different strains of *Staphylococcus aureus*. *J. of Ethnopharma.*, 79 (2002) 359-364.
- 65-**Das Shrayanee , Jyoti Tanwar, Saif Hameed, Zeeshan Fatima.** Antimicrobial potential of epigallocatechin-3gallate (EGCG): a green tea polyphenol. *Journal of Biochemical and Pharmacological Research*, Vol. 2 (3) (2014) 167-174.
- 66-**Dauga Catherine , Joël Doré et Abdelghani Sghir.** La diversité insoupçonnée du monde microbien. Volume 21, numéro 3, URI : id.erudit.org/iderudit/010693ar (2005) DOI : 10.7202/010693ar.
- 67-**Daycem Khlifi, Rabiaa Manel Sghaier, Sameh Amouri, Dhafer Laouinic, Mokhtar Hamdi, JalloulBouajil.** Composition and anti-oxidant, anti-cancer and anti-inflammatory activities of *Artemisia herba-alba*, *Rutachalpensis*L. and *Peganumharmala*L. *Food and Chemical Toxicology* 55 (2013) 202–208.
- 68- **De Santiago, E., Domínguez-Fernández, M., Cid, C., De Peña, M-P.** Impact of cooking process on nutritional composition and antioxidants of cactus cladodes (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry* (2017), doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.039>.
- 69-**Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N.** Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.* 97 (2006) 654–660.
- 70-**Dob T, Benabdelkader T.** Chemical composition of the essential oil of *Artemisia herba-alba* As so grown in Algeria. *J Essen Oil Res* 18 (2006) 685.
- 71-**Dominguez-Rodriguez Gloria, Marina Maria Luisa, Plaza Merichel (2017).** Strategies for the extraction and analysis of non-extractable polyphenols from plants. *Journal of chromatography A*, 1514 (2017) 1-15.
- 72-**Dzink JL., Tanner ACR., Haffajee AD., et al.** Gram negative species associated with active destructive periodontal lesions. *J. Clin. Periodontol* ; 12 (1985) 648-59.

73- **El-Negoumy, S.I., Abdalla, M.F., Saleh, N.A.M.** Flavonoids of *Phlomis aurea* and *P. floccosa*. *Phytochemistry*, 25 (1986) 772–774.

74- **Emami S. A., Abedindo B.F. and Hassanzadeh-Khayyat M.** Antioxidant Activity of the Essential Oils of Different Parts of *Juniperus excelsa M. Bieb. subsp. excelsa* and *J. excelsa M. Bieb. subsp. polycarpus* (K. Koch) Takhtajan (Cupressaceae). *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 10(4) (2011) pp.799–810.

75-**Erdogan Orhan, R. Belhattab, F.S. Senol, A.R. Gülpinar, S. Hosbas, M. Kartal.** Profiling of cholinesterase inhibitory and antioxidant activities of *Artemisia absinthium*, *A. herba-alba*, *A. fragrans*, *Marrubium vulgare*, *M. astranicum*, *Origanum vulgare subsp. glandulosum* and essential oil analysis of two *Artemisia* species. *Industrial Crops and Products* 32 (2010) 566–571.

76-**Esteban-Fernandez Adelaida, Zorraquín-Pena Irene, Gonzalez de Llano Dolores, Bartolomé Begona, Moreno-Arribas M. Victoria.** The role of wine and food polyphenols in oral health. *Trends in Food Science & Technology* 69 (2017) 118-130.

77-**Fagundes H, Barches L, Nader Filho A, Menezes Ferreira L, Fernandes Oliveira CA.** Occurrence of *Staphylococcus aureus* in raw milk produced in dairy farms in Sao Paulo Stat, Brazil. *Braz J Microbiol*; 41 (2010) 376–80. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822010000200018>

78-**Fani Mohammad mehdi and Kohanteb Jamshid.** Inhibitory activity of *Aloe vera* gel on some clinically isolated cariogenic and periodontopathic bacteria. *Journal of Oral Science*, Vol. 54, No. 1 (2012) 15-21.

79-**Fernandez Xavier et Chemat Farid et (2012).** *La chimie des huiles essentielles. Tradition et innovation.* Vuibert, Paris.

80-**Feuerstein I, Danin A, Segal R.** Constitution of the essential oil from an *Artemisia herba-alba* population of Spain. *Phytochem* 27(2) (1988) 433–4.

81-**Fleisher Z, Fleisher A, Nachbar RB.** Chemovariation of *Artemisia herba-alba* Asso. Aromatic plants of the Holy Land and the Sinai Part XVI. *J Ess Oils Res* 14 (2002) 156–60.

82- **Fratini Filippo , Sergio Casella, Michele Leonardi, Francesca Pisseri, Valentina Virginia Ebani, Laura Pistelli, Luisa Pistelli.** Antibacterial activity of essential oils, their blends and mixtures of their main constituents against some strains supporting livestock mastitis. *Fitoterapia* 96 (2014) 1–7.

83-Frias-Lopez J. Biofilm Strategies in dental health. DOI 10.1007/978-3-642-53833-(2014) 9_14, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

84-Gao Shegan, Shuoguo Li, Zhikun Ma, Shuo Liang, Tanyou Shan, Mengxi Zhang, Xiaojuan Zhu, Pengfei Zhang, Gang Liu, Fuyou Zhou, Xiang Yuan, Ruinuo Jia, Jan Potempa, David A. Scott, Richard J. Lamont, Huizhi Wang and Xiaoshan Feng. Presence of *Porphyromonas gingivalis* in esophagus and its association with the clinicopathological characteristics and survival in patients with esophageal cancer. *Infectious Agents and Cancer* 11:3 (2016) DOI 10.1186/s13027-016-0049-x.

85-Ghanmi M., Satrani B., Aafi A., Isamili M. R., Houti H., El Monfalouti H., Benchakroun K. H., Aberchane M., Harki L., Boukir A., Chaouch A., Charrouf Z. Effet de la date de récolte sur le rendement, la composition chimique et la bioactivité des huiles essentielles de l'armoise blanche (*Artemisia herba-alba*) de la région de Guerçif (Maroc). *Phytothérapie*, Volume 8, issue 5 (2010) pp 295-301.

86-Ghazi S. Rouani M. Sekkat Z. L., Il Idrissi A., Arahou M., Hassikou R. Activité anticandidosique de divers extraits d'*Artemisia mesatlantica* M. Lavoisier SAS 2015. *Phytothérapie*, (2015) DOI 10.1007/s10298-015-0998-z.

87-Ghedadba N., Hambaba L., Ayachi A., Aberkane M. C., Bousselsela H., Oueld-Mokhtar S. M. Polyphénols totaux, activités antioxydante et antimicrobienne des extraits des feuilles de *Marrubium deserti* de Noé. *Phytothérapie* 13 (2015) 118-129.

88-Gianmaria F. Ferrazzano, Ivana Amato, AnielloIngenito, Armando Zarrelli, Gabriele Pinto 3 and Antonino Pollio. Plant Polyphenols and Their Anti-Cariogenic Properties: A Review. *Molecules*, 16 (2011) pp 1486-1507.

89-Gibbons, R. J (1984). Adherent interactions which may affect microbial ecology in the mouth. *J. Dent. Res.*, 63 (1984) 378-385.

90-Grube Martin; Katharina Eberhard Barbara Klug. Accuracy of commercial kits and published primer pairs for the detection of periodontopathogens. *Clin Oral Invest* (2016) DOI 10.1007/s00784-016-1748-9.

91-Gultz J, Kaim JM, DeLeo J, Scherer W. An in vivo comparison of antimicrobial activities of three mouthrinses. *J Clin Dent* 9 (1998) 43-45.

- 92- **Gürsoy M, Harju I, Matomäki J, Bryk A, Könönen E.** Performance of MALDI-TOF MS for identification of oral *Prevotella* species, *Anaerobe* (2017), doi: 10.1016/j.anaerobe.2017.04.008.
- 93-**Hadj Sadok T., Aid F., Bellal M., Maria Stela Abdul Hussain.** Composition chimique des jeunes cladodes d'*Opuntia ficus indica* et possibilités de valorisation alimentaire. *Agricultura Științifică și practică* n°: 1-2 (2008) 65-66.
- 94-**Hadj-Seyd A., · Kemassi A., · Hadj Kouider Y., · Harma A.** Traitement de l'infertilité : plantes spontanées du Sahara septentrional. *Phytothérapie* 14 (2016) 241-245.
- 95-**Haffajee D. and Socransky S. S.** Microbiology of periodontal diseases: introduction. *Periodontology* 2000, Vol, 38 (2005) 9-12.
- 96-**Haouari M, Ferchichi A.** Essential oil composition of *Artemisia herba-alba* from Southern Tunisia. *Molecules*, 14 (2009) 1585.
- 97- **Harborne JB, Baxter H .** The handbook of natural flavonoids, Vols 1 and 2. Chichester, UK: John Wiley and Sons (1999).
- 98- **Hassaine Omar (2013).** Caractéristiques d'intérêts technologiques de souches de bactéries lactiques isolées de lait Camelin du sud algérien. Thèse de doctorat. Université d'Oran Es-sénia.
- 99- **Hatimi S, Boudouma M, Bichichi M, et al.** Évaluation in vitro de l'activité antileishmanienne d'*Artemisia herba-alba* Asso., *Thérapeutique*, Manuscrit no 2162 (2000) 57.
- 100- **Havsteen B.** Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol*; 32 (7) (1983) 1141–8.
- 101-**Hfaiedh Najla, Mohamed Salah Allagui, Mbarka Hfaiedh, Abdelfattah El Feki, Lazhar Zourgui, Françoise Croute.** Protective effect of cactus (*Opuntia ficus indica*) cladode extract upon nickel-induced toxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology*. Volume 46, Issue 12 (2008) Pages 3759-3763.
- 102- **Hili P, Evans CS, Veness RG.** Antimicrobial action of essential oils: the effect of dimethylsulphoxide on the activity of cinnamon oil. *Lett Appl Microbiol*, 24 (1997) 269-275.
- 103- **Hirasawa, M., Takada, K. and Otake, S.** Inhibition of acid production in dental plaque bacteria by green tea catechins. *Caries Res.* 40 (2006) 265-270.

104- **Hui Suan Ng, Ai Ni Teoh , Jonathan Chee Woei Lim , Joo Shun Tan , Pik Ki Wan , Hip Seng Yim , Pau Loke Show , John Chi-Wei Lan.** Thermo-sensitive aqueous biphasic extraction of polyphenols from *Camellia sinensis* var. *assamica* leaves. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* (2017) 1-7.

105-**Hussain Javid , Nausheen Bukhari, Hidayat Hussain, Naseem Bano, Abdul Naeem and Ivan R.** Green. Flavonoids and Terpenoids from *Phlomis cashmeriana* and their Chemotaxonomic significance. *Rec. Nat. Prod.* 4:4 (2010) 242-249.

106-**Inouye S., Abe S.** Nouvelle approche de l'aromathérapie anti-infectieuse. *Phytothérapie* Numéro 1 (2007) 2–4.

107-**Jouault Solène (2012).** La qualité des huiles essentielles et son influence sur leur efficacité et sur leur toxicité. Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie. Université de Lorraine. Faculté de pharmacie.

108-**Kabouche Ahmed (2005).** Etude phytochimique de plantes médicinales appartenant à la famille des Lamiaceae. Thèse de Doctorat d'état en chimie. Université Mentouri-Constantine. Faculté des Sciences Exactes. Département de chimie.

109- **Kellogg Joshua J., D.Wallace Emily, Tyler N. Graf, Nicholas H. Oberlies, Nadja B. Cech,** Conventional and accelerated-solvent extractions of green tea (*Camellia sinensis*) for metabolomics-based chemometrics, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [http://dx.doi.org/10 \(1016\) /j.jpba.2017.07.027](http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2017.07.027)

110-**Kordali S, Cakir A, Mavi A, et al.** Screening of chemical composition and antifungal and antioxidant activities of the essential oils from three Turkish *Artemisia* species. *J Agric Food Chem* 53(5) (2005b) 1408–16.

111-**Kordali S, Kotan R, Mavi A, et al.** Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dranunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *Artemisia dranunculus*, *Artemisia santonicum*, and *Artemisia spicigera* essential oils. *J Agric Food Chem* 53 (2005 a) 9452–8.

112-**Kyriakopoulou, I., Magiatis, P., Skaltsounis, A.L., Aligianis, N., Harvala, C.** Samioside, a new phenylpropanoid glycoside with free radical scavenging and antimicrobial activities from *Phlomis samia*. *Journal of Natural Product* 64 (2001) 1095–1097.

- 113-Kuboniwa Masae, Erik L Hendrickson, Qiangwei Xia, Tiansong Wang, Hua Xie, Murray Hackett and Richard J Lamont.** Proteomics of *Porphyromonas gingivalis* within a model oral microbial community. *BMC Microbiology* 9 (2009) 98, 1-14.
- 114-Labbé S., Leke N., Marcotte C., Vayssier C., Duchesne P., Mayrand D. et Duchesne D.** Interactions bactériennes: rôle déterminant lors des maladies parodontales. *REVUE GENERALE Méd Mal Infect.* 28 (1998) 186-92.
- 115-Lambert RJW, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas GJE.** A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.* 91 (2001) 453-462.
- 116-Lamiri A, Belanger A, Berrada M, et al. (1997)** Chemical polymorphism of *Artemisia herba-alba* Asso from Morocco. Rabat, Maroc 69.
- 117-Langenheim Jean H.** Higher plant terpenoids: A phyto-centric overview of their ecological roles. *Journal of Chemical Ecology*, Vol. 20, No. 6 (1994).
- 118-Laouini S Eddine¹, Ouahrani M Redha¹, SegniLadjel.** Influence of solvent extraction on phenolic content, antioxidant and anti-inflammatory activities of aerial parts extract from Algerian *Artemisia Herba-alba*. *Journal of Pharmacy Research*, 10 (1) (2016) 58-64.
- 119-Lawrence BM.** Armoise oil Natural flavor and fragrance materials. In: *Perfumer and Flavorist* (Ed.), *Essential Oils* 1988–1991. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL (1993) pp. 52–4.
- 120-Lazreg H., Memmi A., Baldovini N., Fekih A.** Chemical Composition of tunisian spontaneous *Phlomis crinita* essential oil. *J.Soc.Alger.Chim.*, 21(1) (2011) 15-23.
- 121-Lee, J.H., Jang, M., Seo, J., Kim, G.H. (2011).** Evaluation for antibacterial effects of volatile flavors from *Chrysanthemum indicum* against food-borne pathogens and food spoilage bacteria. *J. Food Safety* 31 (2011) 140–148.
- 122-De Leo M., Bruzual M. De Abreu, Pawlowska A. M., Cioni P. L., Braca A.** Profiling the chemical content of *Opuntia ficus-indica* flowers by HPLC–PDA-ESI-MS and GC/EIMS analyses. *Phytochemistry Letters*. Volume 3, Issue 1 (2010) Pages 48-52.
- 123-Leung NM., Chen R., Rudney JD.** Oral bacteria in plaque and invading buccal cells of young orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2006; 130: 698 (2006) e 11-8.

- 124-Li An-Na, Sha Li, Yu-Jie Zhang, Xiang-Rong Xu, Yu-Ming Chen and Hua-Bin Li.** Resources and Biological Activities of Natural Polyphenols. *Nutrients*, 6, (2014) 6020-6047; doi:10.3390/nu6126020.
- 125-Lolayekar Nikita et Chaitanya Shanbhag (2012).** Polyphenols and oral health. *RSBO*. Jan-Mar; 9 (1) (2012) 74-84.
- 126-Longbottom C. J., Carson C. F., Hammer K. A., Mee B. J., Riley T. V.** Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to *Melaleuca alterifolia* (tea tree) oil is associated with the outer membrane and energy dependant cellular processes, *J. Antimicrob. Chemother* 54 (2004) 386-392.
- 127-Lopez-Lutz D, Alviano DS, Alviano CS, Kolodziejczyk PP.** Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of Artemisia essential oils. *Phytochem*, 69 (2008) 1732-1738
- 128-Loziene K, Venskutonis PR, Sipailiené A, Labokas J.** Radical scavenging and antibacterial properties of the extracts from different *Thymus pulegioides* L. chemotypes. *Food Chem* 103 (2007) 546–59.
- 129-Luczaj, W.; Skrzydlewska, E.** Antioxidative properties of black tea. *Prev. Med.*, 40 (2005) 910-918.
- 130-Mahbourbi, M., Farzin, N.** Antimicrobial activity of *Artemisia sieberi* essential oil from central Iran. *Iranian J Microbiol.* 1 (2009) 43–48.
- 131- Manach Claudine, Augustin Scalbert, Christine Morand, Christian Rémésy and Liliana Jiménez.** Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* : 79 (2004) 727–47.
- 132- Manchado Pascale Sarni et Veronique Cheynier (2006).** Les polyphénols en agroalimentaire. Editions TEC et DOC.
- 133-Mann C. M., Cox S. D., Markham J. L.** The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749 contributes to its tolerance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), *Lett. Appl. Microbiol* 30 (2000) 294-297.
- 134-Marin, P.D., Veitch, N.C., Grayer, R.J., Kite, J.C., Sokovic, M., Janackovic, P.** Flavonoids from *Phlomis fruticosa* (Lamiaceae) growing in Montenegro. *Biochemical and Systematic Ecology* 35 (2007) 462–466.

- 135-**Marrif HI, Ali BH, Hassan KM.** Some pharmacological studies on *Artemisia herba-alba* (Asso.) in rabbits and mice. *J Ethnopharmacol* 49: 51 (1995).
- 136-**Massif L., Frapier L.** Orthodontie et parodontie. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Odontologie/Orthopédie dentofaciale, (2007) 23-490-A-07.
- 137-**Mathiesen C., Scheen A-C and Lindqvist C.** Phylogeny and biogeography of the lamioid genus *Phlomis* (Lamiaceae). *Kew bulletin* Vol. 66 (2011) 83–99.
- 138-**Mättö Jaana, Maria Saarela, Satu Alaluusua, Virva Oja, Hannele Jousimies-Somer, and Sirkka Asikainen.** Detection of *Porphyromonas gingivalis* from Saliva by PCR by Using a Simple Sample-Processing Method. *J Clin Microbiol.* 1998 Jan; 36(1) (1998) 157–160.
- 139-**Mayer, B., Baggio, C.H., Freitas, C.S., dos Santos, A.C., Twardowschy, A., Horst, H., Pizzolatti, M.G., Micke, G.A., Heller, M., dos Santos, E.P., Otuki, M.F., Marques, M.C.A.** Gastroprotective constituents of *Salvia officinalis* L. *Fitoterapia*, 80 (2009) 421–426.
- 140-**Mbata, T. I., Debiao, L. U. and Saikia, A.** Antibacterial activity of the crude extract of Chinese green tea (*Camellia sinensis*) on *Listeria monocytogenes*. *African Journal of Biotechnology* Vol. 7 (10) (2008) pp. 1571-1573.
- 141-**McKay, D.L. and Blumberg, J.B.** The role of tea in human health: An update. *J. Am. Coll. Nutr.* 21 (2002) 1-13.
- 142-**Mehani M., Segni L., Terzi V., Morcia C., Ghizzoni R., Goudgil B., Benchikh S.** Antifungal Activity of *Artemisia herba-alba* on Various *Fusarium*. *Phytothérapie* (2016) 10.1007/s10298-016-1071-2.
- 143-**Mellmann Alexander and Müthing Johannes.** MALDI-TOF Mass Spectrometry-Based Microbial Identification. *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*, (2013) DOI 10.1007/978-1-4614-3970-7_10.
- 144-**Messai Laid, Mohamed-Elamir F. Hegazy, Ahmed A. Ahmed, Kalla Ali, Djaballah Belkacemi, Shinji Ohta.** Sesquiterpene lactones from Algerian *Artemisia herba-alba*. *Phytochemistry Letters* 1 (2008) 85–88.
- 145-**Middleton Jr E, Chithan K.** The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. In: Harborne JB, editor. *The flavonoids: advances in research since 1986*. London, UK: Chapman and Hall; (1993).

- 146-Mighri Hedi, Hafedh Hajlaoui , Ahmed Akrouf , Hanen Najjaa , Mohamed Neffati.** Antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia herba-alba* essential oil cultivated in Tunisian arid zone. *C. R. Chimie* 13 (2010) 380–386.
- 147-Milgrom, P.; Riedy, C.A.; Weinstein, P.; Tanner, A.C.; Manibusan, L.; Bruss, J.** Dental caries and its relationship to bacterial infection, hypoplasia, diet, and oral hygiene in 6- to 36-month-old children. *Community Dent. Oral Epidemiol.*, 28 (2000) 295-306.
- 148-Mitic-C ulafic, D., Vukovic-Gacic, B., Knezevic-Vukcevic , J., Stankovic , S., Simic , D.** Comparative study on the antibacterial activity of volatiles from sage (*Salvia officinalis* L.). *Arch. Biol. Sci.* 57 (2005) 173–178.
- 149-Morand C.** Les polyphénols du thé et du cacao ont-ils des effets santé. *Phytothérapie* 11 (2013) 92-99.
- 150-Moreira MR, Ponce AG, Del Valle CE, Roura SI (2005)** Inhibitory parameters of essential oils to reduce a food borne pathogen. *LWT Food Sci Technol* 38 (2005) 565–70.
- 151-Morteza-Semnani, K., Saeedi, M., Mahdavi, M., Rahimi, F.** The essential oils composition of *Phlomis herba-venti* L. leaves and flowers of Iranian origin. *Pharmaceutical Biology* 44 (2006) 426–429.
- 152-Moussaoui Louardi (2012).** Applications de la spectrométrie de masse type MALDI-TOF à la bactériologie et à la distinction de variants génétiques. Thèse de doctorat. École doctorale sciences de la vie et de la santé. Université de Strasbourg.
- 153-Mueller, M., Hobiger, S., Jungbauer, A.** Anti-inflammatory activity of extracts from fruits, herbs and spices. *Food Chem.*, 122 (2010) 987–996.
- 154-M11-A8.** Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria; approved. Standard-Eighth Edition. Vol.32N°5.
- 155- Natarajan D, John Britto S, Srinivasan K, et al. (2005)** Anti-bacterial activity of *Euphorbia fusiformis*: a rare medicinal herb. *J Ethnopharmacol*, 102 (2005) 123–6.
- 156-Nagano K., Hasegawa Y., Yoshida Y., and Yoshimura F.** A Major Fimbrilin Variant of Mfa1 Fimbriae in *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Dental Research*, Vol. 94(8) (2015) 1143–1148.

157-Nagy Elisabeth, Simone Becker, Markus Kostrzewa, Noe ´mi Barta and Edit Urban. The value of MALDI-TOF MS for the identification of clinically relevant anaerobic bacteria in routine laboratories. *Journal of Medical Microbiology*, 61 (2012) 1393–1400.

158-Naser, B., Bodinet, C., Tegtmeier, M., Lindequist, U. Thuja occidentalis (Arbor vitae): a review of its pharmaceutical, pharmacological and clinical properties. *Adv. Access Publ.* 2 (2005) 69–78.

159-Ncibi Saida, Mahmoud Ben Othman, Amira Akacha, Mohamed Naceur Krifi, Lazhar Zourgui. *Opuntia ficus indica* extract protects against chlorpyrifos-induced damage on mice liver. *Food and Chemical Toxicology* 46 (2008) 797–802.

160-Nikolic Biljana, Dragana Mitic-C ulafic, Branka Vukovic-Gacic, Jelena Knezevic-Vukcevic. Modulation of genotoxicity and DNA repair by plant monoterpenes camphor, eucalyptol and thujone in *Escherichia coli* and mammalian cells. *Food and Chemical Toxicology* 49 (2011) 2035–2045

161- Novilla Arina, Somantri Djamhuri Dedi, Nurhayati Betty, Davidson Rihibiha Dwi, Afifah Ervi, Widowati Wahyu. Anti-inflammatory properties of oolong tea (*Camellia sinensis*) ethanol extract and epigallocatechin gallate in LPS-induced RAW 264.7 cells. *Asian Pac J Trop Biomed* 1-5 (2017).

162-Nunzia Cicco, Maria T. Lanorte, Margherita Paraggio, Mariassunta Viggiano, Vincenzo Lattanzio. A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical Journal* 91 (2009) 107-110.

163-Olfa B, Nadhem F, Soumaya H, JoudaMediouni BJ. Major compounds and insecticidal activities of two Tunisian *Artemisia* essential oils toward two major coleopteran pests. *Industrial Crops and Products*; 65 (2015) 127–133.

164-Palaska,I., et al. Use of polyphenols in periodontal inflammation. *Eur J Pharmacol* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.10.047i>.

165-Park E.-H., Chun M.-J. Wound healing activity of *Opuntia ficus-indica*. *Fitoterapia* 72 (2001) 165-167.

166-Pattnaik S, Subramanyam VR, Bapaji M, Kole CR. Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *Microbios*, 89 (1997) 39-46.

167- **Petruka Ganna, Di Lorenzoa Flaviana, Imbimbo Paola, Silipo Alba, Bonina Andrea, Rizza Luisa, Piccoli Renata, Montia Daria Mari, Lanzetta Rosa.** Protective effect of *Opuntia ficus-indica* L. cladodes against UVA-induced oxidative stress in normal human keratinocytes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2017), <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.10.043>.

168- **Pfan E. A. and Avila-Campos M. J.** *Prevotella intermedia* and *Porphyromonas gingivalis* isolated from osseointegrated dental implants: colonization and antimicrobial susceptibility. *Brazilian Journal of Microbiology* 36 (2005) 281-285. ISSN 1517-8382.

169- **Pierini R, Gee JM, Belshaw NJ, et al.** Flavonoids and intestinal cancers. *Br J Nutr* 99 (2008) 53–9.

170- **Polet Marie, Botteldoorn Nadine et Dierick Katelijne.** MALDI-TOF MS comme outil d'identification de pathogènes alimentaires. *Open.Microbiol.J.* 7 (2013) (2013) 135-41

171- **Presti, M.L., Crupi, M.L., Zellner, B., d0A Dugo, G., Mondello, L., Dugo, P., Ragusa, S.** Characterization of *Artemisia arborescens* L. (Asteraceae) leaf-derived essential oil from Southern Italy. *J. Essent. Oil Res.* 19 (2007) 218–224.

172- **Qnais E., Raad D., Bseiso Y.** Analgesic and Anti-Inflammatory Effects of an Extract and Flavonoids from *Artemisia Herba-Alba* and Their Mechanisms of Action. Volume 46, Issue 3 (2014) pp 238–246.

173- **Quezel, P., Santa, S. (1963).** Nouvelle flore de l'Algerie et des regions desertiques et meridionales. Tome II. Editions CNRS, Paris.

174- **Rusak G., Komes D., Likic S., Horz'ic'D., Kovac'M.** Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. *Food Chemistry* 110 (2008) 852–858.

175- **Saeed Muhammad, Naveed Muhammad, Arife Muhammad, Ullah Kakarf Mohib, Manzoorf Robina, Abd El-Hackg Mohamed Ezzat, Alagawanyg Mahmoud, Tiwarih Ruchi, Khandiai Rekha, Munjali Ashok, Karthikj Kumaragurubaran, Dhamak Kuldeep, Dadarm Hafiz M.N. Iqball, Maryam, Suna Chao.** Green tea (*Camellia sinensis*) and L-theanine: Medicinal values and beneficial applications in humans—A comprehensive review. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 95 (2017) 1260-1275.

176- **Sagdic O, Ozcan M.** Antibacterial activity of Turkish spice hydrosols. *Food Control Elsevier* 14 (2003) 141.

177-**Sakanaka Senji and Yuki Okada (2004)**. Inhibitory Effects of Green Tea Polyphenols on the Production of a Virulence Factor of the Periodontal-Disease-Causing Anaerobic Bacterium *Porphyromonas gingivalis*. *J. Agric. Food Chem.*, 52 (2004) 1688-1692.

178-**Salah SM, Jager AK**. Screening of traditionally used Lebanese herbs for neurological activities. *J Ethnopharmacol*, 97 (1) (2005) 145–9.

179-**Saleh N. A. M., El-Negoumy S. I., Abd-Alla M. F., Abou-Zaid M. M., Dellamonica G. and Chopin J**. Flavonoids glycosides of *Artemisia monosperma* and *A. herba-alba*. *Phytochemistry*, 24 (1) (1985) 201-203.

180-**Saleh NAM, El-Negoumy SI, Abou-Zaid MM**. Flavonoids of *Artemisia judaica*, *A. monosperma* and *Artemisia herba-alba*. *Phytochemistry* 26(11) (1987) 3059–64.

181-**Salido Sofia, Luis R. Valenzuela, Joaquin Altarejos, Manuel Nogueras, Aldolfo Sanchez, Eusebio Cano**. Composition and infraspecific variability of *Artemisia herba-alba* from southern Spain. *Biochemical Systematics and Ecology* 32 (2004) 265–277.

182-**Sangmanee Kitti Cha, Catherine Donzel, Stéphane Melchior-Durand et Alain Stella (1999)**. L'ABC daire du thé. Edition France loisir, Paris.

183-**Santigli Elisabeth, Eva Leitner, Gernot Wimmer, Harald H. Kessler, Gebhard Feierl, Martin Grube, Katharina Eberhard and Barbara Klug**. Accuracy of commercial kits and published primer pairs for the detection of periodontopathogens. *Clin Oral Invest*, (2016) DOI 10.1007/s00784-016-1748-9.

184-**Sbayou Houda, Bouchra Ababou, Khadija Boukachabine, Angeles Manresa, Khalid Zerouali and Souad Amghar**. Chemical Composition and Antibacterial Activity of *Artemisia herba-alba* and *Mentha pulegium* Essential Oils. *J.*, Vol. 8, No. 1 (2014) pp. 35-41. *Journal of Life Sciences*, ISSN 1934-7391, USA.

185-**Schwarz, R. Schweppe (2008)**. Thé vert. Elixir de vie pour le corps et l'esprit. Edition Vigot.

186-**Sekkat Z. L., M. Rouani, S. Ghazi, A. Il Idrissi, M. Arahou, R. Hassikou**. Caractérisation chimique des huiles essentielles *d'Artemisia mesatlantica* et évaluation de leur potentiel anticandidosique. *Phytothérapie*, (2015) DOI 10.1007/s10298-015-1017-4.

187-Selka M. A., Chenafa A., Achouri M. Y., Aoued L., Tareb S., Nourredine M. A., Toumi H. Activité antimicrobienne et antioxydante des feuilles de *Vitis vinifera L.* Phytothérapie 14 (2016) 363-369.

188-Shoji Mikio, Koji Nakayama. Glycobiology of the oral pathogen *Porphyromonas gingivalis* and related species. Microbial Pathogenesis, (2015) 1-7.

189-Simpson Kerri T., John G. Thomas. Oral Microbiome: Contributions to Local and Systemic Infections. Curr Oral Health Rep., 3 (2016) 45–55.

190-Sixou T., Diouf A. M., Alvares D. Biofilm buccal et pathologies buccodentaires. ANTIBIOTIQUES, 2007 ; 9 (2007) 181-8.

191-Sokovic, M., Glamoclija, J., Marin, P.D., Brkic, D., van Griensven, L.J.L.D. Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model. Molecules 15 (2010) 7532–7546.

192-Slots J., Listgarten MA. Bacteroides gingivalis, Bacteroides intermedius and Actinobacillus actinomycetem comitans in human periodontal diseases. *J. Clin. Periodontol* 1988; 15 (1988) 85-93.

193-Smida A., Ncibi S., Taleb J., Ben Saad A., Ncib S., Zourgui L. Immunoprotective activity and antioxidant properties of cactus (*Opuntia ficus indica*) extract against chlorpyrifos toxicity in rats. Biomedicine and Pharmacotherapy, 88 (2017) 844-851.

194-Sumit Bansal, ShivaniChoudhary, Manu Sharma, Suthar Sharad Kumar, Sandeep Lohan, Varun Bhardwaj, NavneetSyam, SarasJyoti. Tea: A native source of antimicrobial agents. Food Research International 53 (2013) 568–584.

195-Takayuki Maruyama, Takaaki Tomofuji, Yasumasa Endo, Koichiro Irie, Tetsuji Azuma, Daisuke Ekuni, Naofumi Tamaki, Tatsuo Yamamoto (2011). Supplementation of green tea catechins in dentifrices suppresses gingival oxidative stress and periodontal inflammation. Archives of oral biology 56 (2011) 48-53.

196-Tamert A., Latreche A. (2015). Activité antioxydante des extraits de six Lamiaceae aromatiques de l'Algérie occidentale Phytothérapie, (2015) DOI 10.1007/s10298-015-1016-1.

197-Toitot Clarisse, Adebitech , Margaret Varkados-Lemarechal (2016). Résistance aux antibiotiques : une approche intégrée de l'environnement à l'Homme. ANTIBIO.Compte-rendu du Colloque adebiotech.

- 198-**Treutter D.** Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. *Plant Biol (Stuttg)*, 7(6) (2005) 581–91.
- 199-**Turkmen N., Sari F. and Velioglu Y. S.** Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin–Ciocalteu methods. Vol.99 (2006) 835-841.
- 200-**Ulukanli Z, Akkaya A.** Antibacterial Activities of *Marrubium catariifolium* and *Phlomis pungens* var. *Hirta* Grown Wild in Eastern Anatolia, Turkey. *Int J Agric Biol*, 13 (2011) 105–9.
- 201-**van Winkelhoff AJ, Loos BG, van der Reijden WA, van der Velden U.** *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *J Clin Periodontol*; 29 (2002) 1023–1028.
- 202-**Vernin G, Merad O, Vernin GMF, et al.** GC-MS analysis of *Artemisia herba-alba* Asso essential oil from Algeria. *Dev Food Sci* 37A (1995) 147–205
- 203- **Volpe, M., Goldfarb, J.L., Fiori, L.,** Hydrothermal carbonization of *Opuntia ficusindica* cladodes: Role of process parameters on hydrochar properties, *Bioresource Technology*, (2017) doi: [http:// dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.072](http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.072)
- 204- **Wang Xiaoqin, Zeng Qiumei, Contreras María del Mar, Wang Lijuan.** Profiling and quantification of phenolic compounds in *Camellia* seed oils: Natural tea polyphenols in vegetable oil. *Food Research International*, 102 (2017) 184-194.
- 205-**Wieser- Andreas, Schneider Lukas, Jette Jung and Sören Schubert.** MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics—identification of microorganisms and beyond (mini review). *Appl Microbiol Biotechnol*, 93 (2012) 965–974.
- 206-**Willems Hubertine ME, Zhenbo Xu and Brian M Peters.** Polymicrobial Biofilm Studies: from Basic Science to Biofilm Control. *Curr Oral Health Rep*, 3 (2016) 36–44.
- 207-**Xia En-Qin, Gui-Fang Deng, Ya-Jun Guo and Hua-Bin Li.** Biological Activities of Polyphenols from Grapes. *Int. J. Mol. Sci.*, 11 (2010) 622-646.
- 208-**Yashphe J, Feuerstein I, Barel S, Segal R.** The antibacterial and antispasmodic activity of *Artemisia herba-alba* Asso. II. Examination of essential oils from various chemotypes. *Int J Cru de Drug Res* 25 (1987) 89.

209-Zafalon LF, Nader Filho A, Oliveira JV, Resende FD. Subclinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*: cost benefit analysis of antibiotic therapy in lactating cows. *Arq Bras Med Vet Zoo*; 59 (2007) 577–85. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352007000300005>.

210-Zaim Assia, El Ghadraoui Lahsen et Abdellah Farah. Effets des huiles essentielles d'*Artemisia herba-alba* sur la survie des criquets adultes d'*Euchorthippus albolineatus* (Lucas, 1849). *Bulletin de l'Institut Scientifique, Rabat, section Sciences de la Vie*, n° 34 (2) (2012) p. 127-133.

211-Zhong Xian-ke, Xin Jin, Feng-Ying Lai, Qing-Sheng Lin, Jian-Guo Jiang. Chemical analysis and antioxidant activities *in vitro* of polysaccharide extracted from *Opuntia ficus indica* Mill. cultivated in China. *Carbohydrate Polymers* 82 (2010) 722-727.

212-Zouari Sami, Nacim Zouari, Nahed Fakhfakh, Ali Bougatef, M. A. Ayadi and Mohamed Neffati. Chemical composition and biological activities of a new essential oil chemotype of Tunisian *Artemisia herba alba* Asso. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 4(10), (2010) pp. 871-880, 18 May, 2010.

Annexes

Les séquences obtenues après séquençage de l'ARN 16 S

>1001.16_1848 -- 95..211 of sequence

```
CCGGAGAATCGCGTATCCAACCTGCCCTTACTTGGGGATACCCCGTTGAAAGACGGCCT  
AATACCCGATGTGTTTCATTGACGGCATCCGATATGAAACAAAGGTTTTCCCGGAAA
```

>1001.16_1849 -- 86..738 of sequence

```
ATTCGGGCCCCGGGAACGTATTCACCGCGCCATGGCTGATGCGCGATTACTAGCGAATCCA  
GCTTCGTGGGGTTCGGGTTGCAGACCCCAGTCCGAACCTGGGACCGGATTTCAAGATTGGAT  
GCAACTTGCATTACACCGTCCCTCTGTACCGGCCATTGTAACACGTGTGTAGCCCCGGAC  
GTAAGGGCCGTGCTGATTTGACGTCATCCCCACCTTCTCGCACCTTGCGGTGGCAGTGT  
CCCCAGAGTGCCCGGCATACCCGATGGCAACTGGGAAAGGGGGTTGCGCTCGTTATGGC  
ACTTAAGCCGACACCTCACGGCACGAGCTGACGACAACCATGCAGCACCTTCACAGACGC  
CCCGAAGGGAAGCCCACGTCTCTGTGGGCAGCGACTGCAATTCAAGCCCCGGTAAGGTT  
CTCGCGTATCATCGAATTAACCATGTTCTCCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCC  
TTTGAGTTTACCAGTTGCCGGCGTACTCCCCAGGTGGGATGCTTAATGCTTTCGCTTGGC  
CGCAGGCGCAGGGCGCCACGGCGGGCATCCATCGTTTACTGTGCGGACTACCAGGGTAT  
CTAATCCTGTTTCGATACCCGCACCTTCGAGCTTAAGCGTCAGTAACACTCGC
```

>1001.16_1849 -- 86..437 of sequence

```
ATTCGGGCCCCGGGAACGTATTCACCGCGCCATGGCTGATGCGCGATTACTAGCGAATCCA
```

```
GCTTCGTGGGGTTCGGGTTGCAGACCCCAGTCCGAACCTGGGACCGGATTTCAAGATTGGAT  
GCAACTTGCATTACACCGTCCCTCTGTACCGGCCATTGTAACACGTGTGTAGCCCCGGAC  
GTAAGGGCCGTGCTGATTTGACGTCATCCCCACCTTCTCGCACCTTGCGGTGGCAGTGT  
CCCCAGAGTGCCCGGCATACCCGATGGCAACTGGGAAAGGGGGTTGCGCTCGTTATGGC  
ACTTAAGCCGACACCTCACGGCACGAGCTGACGACAACCATGCAGCACCTTC
```

>1002.16_1848 -- 92..217 of sequence

```
CGGGAATCGCGTATCCAACCTGCCCTTACTTGGGGATACCCCGTTGAAAGACGGCCTAA
TACCCGATGTGTTTCATTGACGGCATCCGATATGAAACAAAGGTTTTCCGGGTAGGGATG
GGGAAG
```

>1002.16_1849 -- 91..447 of sequence

```
CGGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGCCATGGCTGATGCGCGATTACTAGCGAATCCAGCT
TCGTGGGGTTCGGGTTGCAGACCCCAGTCCGAACCTGGGACCGGATTTCAAGATTGGATGCA
ACTTGCGTTACACCGTCCCTCTGTACCGGCCATTGTAACACGTGTGTACCCCGGACGTA
AGGGCCGTGCTGATTTGACGTCATCCCCACCTTCTCGCACCTTGCGGTGGCAGTGTCCC
CAGAGTGCCCGGCATCACCCGATGGCAACTGGGAAAGGGGTTGCGCTCGTTATGGCACT
TAAGCCGACACCTCACGGCACGAGCTGACGACAACCATGCAGCACCTTCGCAGACGC
```

>1002.16_1849 -- 425..838 of sequence

```
ATGAAGCACCTTCACAGACGCCCCGAAGGGAAGCCACGTCTCTGTGGGCAGCGACTGCA
ATTCAAGCCCGGTAAGGTTCCCTCGCGTATCATCGAATTAACCACATGTTCCCTCCGCTT
GTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCACCGTTGCCGGCGTACTCCCCAGGTGGGA
TGCTTAATGCTTTCGCTTGCCCGCAGGCGCAGGGCGCAACGGCGGGCATCCATCGTTTA
CTGTGCGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGATACCCGCACCTTCGAGCTTAAGCGT
CAGTAACACTCCCGCAGGCTGCCTTCGCGATCGGAGTTCCTCGTGATATCTAAGCATTTC
ACCGCTACACCATGAATTCCGCTGCGCTGCGTGTACTCAAGTCTGACAGTTTCG
```

>994.16_1848 -- 34..919 of sequence

```
AAGGTAGCCGTAAGCTTGGATCCCGGGATGCACATTCTGGACGTGACCCGGCGCACGGGT
GAGTATCGCGTATCCAACCTTCCCTCCACTCGGGGATACCCCGTTGAAAGACGGCCTAAT
ACCCGATGTTGTCCACAGATGGCATCTGACGTGGACCAAAGATTCATCGGTGGAGGATGG
GGATGCGTCTGATTAGCTTGTGGTGCGGGTAACGGCCACCAAGGCTACGATCAGTAGG
GGTCTGAGAGGAAGGTCCCCACATTGGAACCTGAGACACGGTCCAAACTCCTACGGGAG
GCAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGGACGGAGGTCTGAACCAGCCAAGTAGCGTGCAGG
ATTGACGGCCCTATGGGTTGAAACTGCTTTTGTGGGGAGTAAAGTGAGGCACGCGTGC
CTTTTTGCATTTACCTTCGAATAAGGACCGGCTAATTCCTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
ACGGAAGGTCCAGGCGTTATCCGGATTTATTGGGTTAAAGGGAGTGTAGGCGGTCTGTT
AAGCGTGTGTGAAATTTAGGTGCTCAACATCTAACTTGCAGCGCAACTGGCGGACTTG
AGTGCACGCAACGTATGCGGAATTCATGGTGTAGCGGTGAAATGCTTAGATATCATGACG
AACTCCGATTGCGAAGGCAGCGTACGGGAGTGTACTGACGCTTAAGCTCGAAGGTGCGG
GTATCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCGCACGGTAAACGATGGATGCCCCGTGTT
AGCGCTGGCGTTAGCGGCTAAGCGAAAGCATTAAAGCATCCCACCTGGGGAGTACGCCGG
CAACGGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGAA
```

>995.16_1848 -- 89..910 of sequence

```
GGTGAGTATCGCGTATCCAACCTTCCCTCCACTCGGGGATACCCCGTTGAAAGACGGCCT
AATACCCGATGTTGTCCACAGATGGCATCTGACGTGGACCAAAGATTCATCGGTGGAGGA
TGGGGATGCGTCTGATTAGCTTGTGGTGCGGGTAACGGCCCACCAAGGCTACGATCAGT
AGGGGTCTGAGAGGAAGGTCCCCACATTGGAAGTGAACACGGTCCAAACTCCTACGG
GAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGGACGGAAGTCTGAACCAGCCAAGTAGCGTGC
AGGATTGACGGCCCTATGGGTTGTAAACTGCTTTTGTGGGGAGTAAAGTGAGGCACGCG
TGCCTTTTGCATTTACCCTTCGAATAAGGACCGGCTAATTCCGTGCCAGCAGCCGCGGT
AATACGGAAGGTCCAGGCGTTATCCGGATTATTGGGTTTAAAGGGAGTGTAGGCGGTCT
GTTAAGCGTGTGTGAAATTTAGGTGCTCAACATCTAACTTGCAGCGCGAACTGGCGGAC
TTGAGTGCACGCAACGTATGCGGAATTCATGGTGTAGCGGTGAAATGCTTAGATATCATG
ACGAACTCCGATTGCGAAGGCAGCGTACGGGAGTGTTACTGACGCTTAAGCTCGAAGGTG
CGGGTATCGAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCGCACGGTAAACGATGGATGCCCGCT
GTTAGCGCCTGGCGTTAGCGGCTAAGCGAAAGCATTAAAGCATCCCACCTGGGGAGTACGC
CGGCAACGGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACA
```

>00996_1848 -- 42..684 of sequence

```
TGCAAGTCGAGGGGAAACGGCATTATGTGCTTGACATTCTGGACGTCGACCGGCGCACG
GGTGAGTATCGCGTATCCAACCTTCCCTCCACTCGGGGATACCCCGTTGAAAGACGGCCT
AATACCCGATGTTGTCCACAGATGGCATCTGACGTGGACCAAAGATTCATCGGTGGAGGA
TGGGGATGCGTCTGATTAGCTTGTGGTGCGGGTAACGGCCCACCAAGGCTACGATCAGT
AGGGGTCTGAGAGGAAGGTCCCCACATTGGAAGTGAACACGGTCCAAACTCCTACGG
GAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGGACGGAAGTCTGAACCAGCCAAGTAGCGTGC
AGGATTGACGGCCCTATGGGTTGTAAACTGCTTTTGTGGGGAGTAAAGTGAGGCACGCG
TGCCTTTTGCATTTACCCTTCGAATAAGGACCGGCTAATTCCGTGCCAGCAGCCGCGGT
AATACGGAAGGTCCAGGCGTTATCCGGATTATTGGGTTTAAAGGGAGTGTAGGCGGTCT
GTTAAGCGTGTGTGAAATTTAGGTGCTCAACATCTAACTTGCAGCGCGAACTGGCGGAC
TTGAGTGCACGCAACGTATGCGGAATTCATGGTGTAAACGGTGA
```

>00997_1848 -- 24..677 of sequence

```
AGGTAGCCGTAAGCTTGGATCCCAGGAGAAACGGCATTATGTGCTTGCACATTCTGGACG
TCGACCGGCGCACGGGTGAGTATCGCGTATCCAACCTTCCCTCCACTCGGGGATACCCCG
TTGAAAGACGGCCTAATACCCGATGTTGTCCACAGATGGCATCTGACGTGGACCAAAGAT
TCATCGGTGGAGGATGGGGATGCGTCTGATTAGCTTGTGGTGCGGGTAACGGCCCACCA
AGGCTACGATCAGTAGGGTTCTGAGAGGAAGGTCCCCACATTGGAAGTGGACACGGT
CCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGGACGGAAGTCTGAACCA
GCCAAGTAGCGTGCAGGATTGACGGCCCTATGGGTTGTAAACTGCTTTTGTGGGGAGTA
AAGTGAGGCACGCGTGCCTTTTGCATTTACCCTTCGAATAAGGACCGGCTAATCCGTG
CCAGCAGCCGCGTAATACGGAAGGTCCAGGCGTTATCCGGATTTATTGGGTTAAAGGG
AGTGTAGGCGGTCTGTTAAGCGTGTGTGAAATTTAGGTGCTCAACATCTAAGTTCGACG
CGAACTGGCGGACTTGAGTGCACGCAACGTATGCGGAATTCATGGTGTAGCGG
```

>00998_1849 -- 46..894 of sequence

```
ACATCGGTATACGAACTTCAGGCACCCCCGGCTTTCATGGCTTGACGGGCGGTGTGTACA
AGGCCCCGGAACGTATTCACCGCGCCATGGCTGATGCGGATTACTAGCGAATCCAGCTT
CGTGAGGTCGGGTTGCAGACCTCAGTCCGAACTGGGACCGGCTTCAAGATTGGATGCGA
TTTGCATCGCACCGTCCCTCTGTACCGGCCATTGTAACACGTGTGTAGCCCCGGACGTAA
GGGCCGTGCTGATTTGACGTCATCCCCACCTTCTCACACCTTGCGGTGGCAGTGTCCCC
AGAGTGCCCAGCATGACCTGATGGCAACTAAGGAAAGGGGTTGCGCTCGTTATGGCACTT
AAGCCGACACCTCACGGCACGAGCTGACGACAACCATGCAGCACCTTACAGACGCCCCG
AAGGGAGTCAACATCTCTGTATCCTGCGTCTGCAATTCAGCCCCGGTAAGGTTCTTCGC
GTATCATCGAATTAACCACATGTTCTCCGCTTGTGCGGGCCCCGTC AATTCCTTTGA
GTTTCACCGTTGCCGGCGTACTCCCCAGGTGGGATGCTTAATGCTTTCGCTTAGCCGCTA
ACGCCAGGCGCTAACAGCGGGCATCCATCGTTTACCGTGCGGACTACCAGGGTATCTAAT
CCTGTTTCGATACCCGCACCTTCGAGCTTAAGCGTCAGTAACACTCCCGTACGCTGCCTC
GCAATCGGAGTTCGTATGATATCTAAGCATTTACCGCTACACCATGAATTCGCATAC
GTTGCGTGCACTCAAGTCCGCCAGTTCGCGCTGCAAGTTAAATGTTGAGCACCTAAATTT
CACAAACACG
```

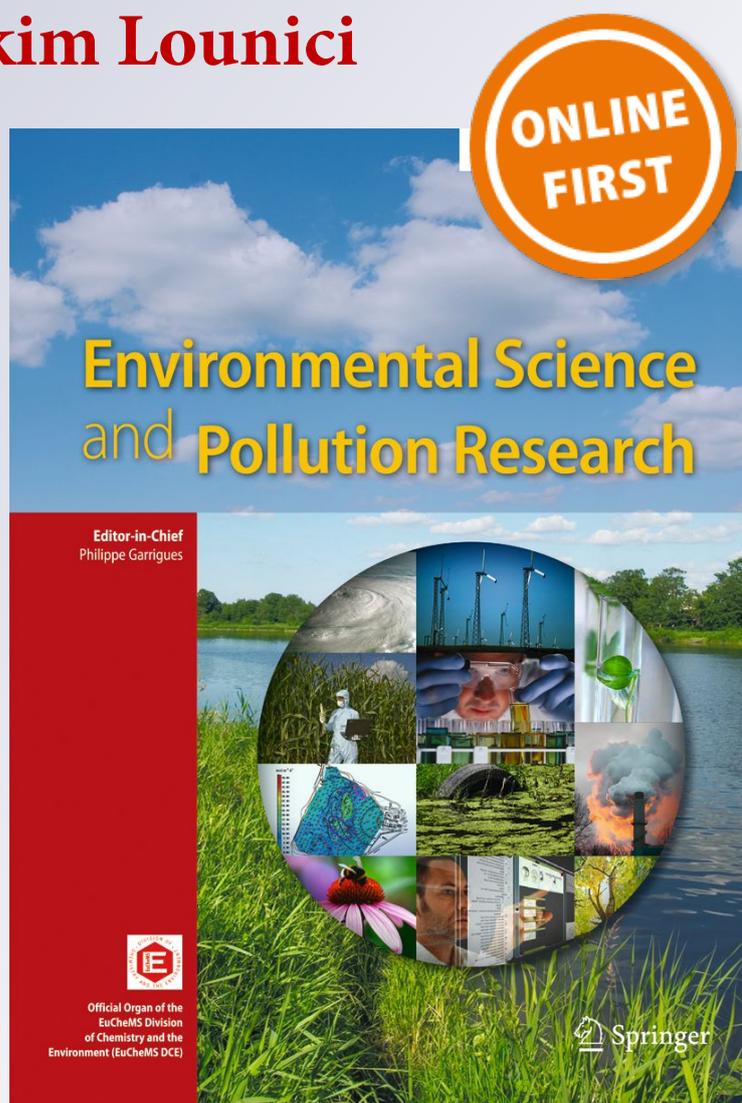
Antimicrobial activity of aqueous extracts from four plants on bacterial isolates from periodontitis patients

Leila Arbia, Nassima Chikhi-Chorfi, Ilhem Betatache, Chuong Pham-Huy, Selma Zenia, Nabil Mameri, Nadjib Drouiche & Hakim Lounici

Environmental Science and Pollution Research

ISSN 0944-1344

Environ Sci Pollut Res
DOI 10.1007/s11356-017-8942-4



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer-Verlag Berlin Heidelberg. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".

Antimicrobial activity of aqueous extracts from four plants on bacterial isolates from periodontitis patients

Leila Arbia¹ · Nassima Chikhi-Chorfi^{1,2} · Ilhem Betatache³ · Chuong Pham-Huy⁴ · Selma Zenia¹ · Nabil Mameri^{1,5} · Nadjib Drouiche^{7,8} · Hakim Lounici^{1,6}

Received: 24 January 2017 / Accepted: 27 March 2017
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2017

Abstract Four aqueous extracts of different plant organs are the following: *Artemisia herba-alba*, *Opuntia ficus-indica*, *Camellia sinensis* and *Phlomis crinita* were evaluated against two bacterial strains: *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia*, which are implicated in periodontal diseases. By using a disc method, these plant extracts demonstrated powerful bacterial activity against these Gram-negative strains. The minimum inhibitory concentration values of the four plant extracts varied between 0.03 and 590.82 mg/ml for the microbes. Another assay using commercial antibiotics and antibacterials as positive controls was also conducted. Values obtained after statistical analysis of inhibition diameters of all plant extracts demonstrated that for

P. gingivalis, the aqueous extracts of *A. herba-alba* and *O. ficus-indica* were most effective, followed by those of *C. sinensis* and *P. crinita*. For *P. intermedia*, aqueous extracts of *O. ficus-indica* and *C. sinensis* appeared to be more efficient with significantly different ($P > 0.05$) inhibition diameters, followed by those of *O. ficus-indica* and *P. crinita*. In summary, the statistical results reveal that these plant extracts exert stronger antibacterial activity on *P. intermedia* germ as compared to *P. gingivalis*.

Keywords *Artemisia herba-alba* · *Opuntia ficus-indica* · *Camellia sinensis* · *Phlomis crinita* · Antibacterial activity · *Porphyromonas gingivalis* · *Prevotella intermedia*

Responsible editor: Philippe Garrigues

✉ Nadjib Drouiche
nadjibdrouiche@yahoo.fr

¹ Ecole Nationale Polytechnique d'Alger, Laboratoire BIOGEP, B.P. 182-16200, El Harrach, Alger, Algeria

² Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger, BP 161, 16200 El Harrach, Alger, Algeria

³ Institut Pasteur d'Algérie, Service des Anaérobies, Route du petit staouéli, Dély-Brahim, Algeria

⁴ Laboratoire de Toxicologie, Faculté de Pharmacie, Université de Paris V, 4 avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France

⁵ Département Génie chimique, Université de Technologie de Compiègne, B.P. 20.509, 60205 Compiègne Cedex, France

⁶ Université de Bouira, Bouira, Algeria

⁷ Centre de Recherche en Technologie des Semi-conducteurs de l'Energetique (crtse), Algiers, Algeria

⁸ Department of Environmental Engineering 2, Technology of Semi-conductor for the Energetic Research Center, Bd Frantz Fanon BP140 Alger-7-merveilles, 16038 Algiers, Algeria

Introduction

The oral cavity represents one of the most complex collections of microorganisms and represents a very important passage for entry of agents responsible of infectious diseases. Several hundreds of microbial species cohabit in the buccal environment. By accumulation of pathogenic bacteria in periodontal pockets, an infectious disease called periodontitis develops. Periodontitis is a result of an ecological imbalance within the resident microbial community of the dental plaque, thus favouring growth of pathogenic species initially present in lower amounts (Grenier and Mayrand 2000). These niches, once created, foster a pathogenic bacterial flora growth and cause micro-ulcerations in tissues and allowing them to pass into the bloodstream and remotely migrate to other organs, such as the heart, resulting in cardiovascular diseases among others.

A number of studies have demonstrated an association between seriousness of the periodontal illness and risks of coronary heart disease and stroke (Beck and Offenbacher 1998).

This association may be due to the underlying inflammation, which puts a person in a high risk to develop, at the same time, periodontal disease and atherosclerosis (Beck et al. 1996).

Periodontal illnesses are inflammatory diseases of bacterial origin that are widespread (Houle and Grenier 2003; Anagnostou et al. 2011) and involve a group of anaerobic Gram-negative bacteria. Unlike gingivitis (reversible inflammatory conditions), periodontitis is characterized by the irreversible destruction of tissues that support the tooth. The periodontium tissue destruction is the result of a weak immunoinflammatory response of the organism against the bacteria. If left untreated, periodontitis can lead to a decrease of periodontal support and the eventual loss of the tooth (Anagnostou et al. 2011). Epidemiological studies revealed that about 10% of the population suffers from severe and generalized form of periodontitis (Houle and Grenier 2003).

The principal pathogenic agents involved in the periodontitis are: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Tannerella forsythia*, *Corredens eikenella* and *Treponema denticola* (Zarco et al. 2012; Filoche et al. 2010; Dashiff and Kadouri 2011). Among these microorganisms, *P. gingivalis* is considered as the agent with the highest pathogenicity. However, several studies have quite clearly shown the difficulty to consider only one bacterial species as a marker of periodontitis; by contrast, they confirm the presence of several bacteria in this medical condition (Palmer 2014). Hence, the sub-gingival plaque buildup responsible for this oral pathology leads to changes in the microflora from a physiological state to a medical condition (Zarco et al. 2012; Horz and Conrads 2007; Filoche et al. 2010). In addition, the gingivitis and/or chronic periodontitis represent a constant bacteraemia source for the organism. Periodontal diseases have different virulence factors allowing them to settle sub-gingival sites, to escape the host defense system and to create tissue damage. The host immune response to constant bacterial aggression is a determinant factor in the disease progression. A certain number of cytokines (IL-1, IL-6, IL-8 and TNF- α) of inflammation's mediators (PGE2) and of matrix metalloproteinase (MMP-2, MMP-3, MMP-8 and MMP-9) have been associated with periodontal diseases progression (Houle and Grenier 2003).

Today, bacterial infections that are unresponsive to known antibiotics under the name of antibiotic resistance are more and more numerous, where the recourse to the phytotherapy seems like a viable option. Therefore, during the last decade, studies focused on medicinal plants that have bactericidal and anti-inflammatory activity as likely sources to treat these oral pathological conditions. Plants represent a very rich source of natural compounds likely to have antimicrobial activities, knowing that some have been incorporated in oral care products (Jhahharia et al. 2015). However, their applications in oral pathology remain less studied.

The widespread incidence of periodontal disease, its importance and bacterial resistance to antibiotics led us to study the antibacterial effects of different and well-known plants such as *Artemisia herba-alba* (Mighri et al. 2010; Tsai et al. 2008; Khelifi et al. 2013; Mohamed et al. 2010), *Phlomis crinita* (Tamert and Latreche 2016; Kabouche et al. 2004; Limem-Ben Amor et al. 2009; Hussain et al. 2010), Prickly pear *Opuntia ficus-indica* (Ncibi et al. 2008; Alimi et al. 2013; Betatache et al. 2014; Fedala et al. 2015; Bargougui et al. 2014) and Tea plant (*Camellia sinensis*) (Pham-Huy et al. 2008a, b; Araghizadeh et al. 2013; Mak 2012; Bansal et al. 2013). The purpose of this study was to investigate current natural products that are non-toxic or with a low toxicity in order to develop phytotherapy as an alternative method in oral medicine. This work also compares bactericidal effects of these plant extracts to those obtained from known antibiotics in the same conditions experimented in vitro.

Material and methods

Plant material

Samples of three plants: *A. herba-alba* (stem, leaves and flowers, arid climatic conditions and stage adult), *P. crinita* (leaves, stage adult) and the cladodes of *Opuntia ficus-indica* (stage 3 of growth: large size of cladodes, length is 19.95 cm and the width of 9.1 cm) (warm temperate climate) were harvested in Algeria during the month of May in the following regions: Boussada Souk El Khemis and Lakhdaria (South of Algeria) respectively. Identification of plants was confirmed by Professors R. Amirouche and N. Amirouche, Laboratory for Ecology and Genetics of USTHB (University of Sciences and Technologies Houari Boumediène) Algiers, Algeria.

Freshly harvested aerial parts (stem, leaf and flowers) of *A. herba-alba* and of *P. crinita* were dried in shade in a dry and well-ventilated area. After drying, samples were gathered in clean paper bags. Another plant was the subject of this work; it is leaf of tea plant *C. sinensis*, manufactured under the trade name of Green Tea was obtained from a commercial source.

Microorganisms

The bacterial strains selected for this study were *P. gingivalis* and *P. intermedia* as they are considered major causative agents in initiation and progression of periodontal disease (Ferrazzano et al., 2011; Nagano et al., 2015). The reference strain ATCC 33277 of *P. gingivalis* was gracefully provided by the National Center Laboratory for Anaerobic and Botulism, Pasteur Institute Paris. Likewise, clinical strains of *P. gingivalis* and of *P. intermedia* were isolated from patients with periodontal diseases (chronic and aggressive) at the Stomatology Department in CHU Mustapha Bacha Algiers,

followed by identification and archiving. Strains were cultured and isolated on Columbia ANC agar supplemented with 5% sheep blood. Bacterial growth was carried out at 37 °C in anaerobic conditions for 5 days (Chardin et al. 2006). The agar Columbia is an excellent basis for the preparation of a blood agar. It is composed of a special mixture of peptones, starch, sodium chloride and agar. Its pH is about 7.3.

Preparation of plants extracts

O. ficus-indica gel preparation

Rackets of *O. ficus-indica* were cleaned, dried and, after removal of spines, were ground until they yielded a viscous and homogeneous gel.

Extraction in an aqueous medium

Aqueous extracts (Aq-e) were prepared from different plants as quoted above. Aqueous extraction was obtained by macerating the previously ground plant materials in 100 ml of sterile distilled water and mixing for 15 min at 80 °C under sterile conditions.

Phytochemical analysis

Total polyphenol contents of the phytoextracts

The quantitative analysis of total polyphenols (TPP) was determined by spectrophotometry according to the method of Folin-Ciocalteu by phosphotungsto-molybdic yellow color constituted by the mixture of phosphotungstic and phosphomolybdic acids (Boizot and Charpentier 2006; Cicco et al. 2009).

To carry out the calibration curve, gallic acid was used at a concentration range of 0.005–0.05 mg/ml. Results were expressed in milligrams of gallic acid per sample's gram (Turkmen et al. 2006).

Sampling, isolation and identification of clinical strains

Sampling and isolation

Forty oral samples were collected from patients of both sexes, representing a group age between 12 and 55 years affected with periodontal disease (both aggressive and chronic) being treated at the Department of Stomatology, Mustapha Bacha Hospital in Algiers. With the use of sterile pliers, sterile absorbent paper cones were introduced inside the periodontal pockets of each patient. Once the periodontal juice was absorbed, the paper cone was quickly transferred into test tubes containing a media exempt of oxygen adapted for anaerobic bacteria. Strains were cultivated with agar Columbia

ANC supplemented with 5% sheep blood. The bacterial growth was carried out at 37 °C in anaerobic conditions for 5 days (Chardin et al. 2006).

Strain identification

The isolation of the strains was performed by seeding the first culture on agar Columbia. After incubation for 5 days at a temperature of 37 °C, a mixed culture which constitutes the bacterial film of the periodontal pocket was developed. Then, we picked out the black pigmented colonies to inoculate them on a new Columbia agar and so on until a pure culture was obtained which contained only colonies pigmented in black.

Identification of the strain *P. gingivalis* was performed by polymerase chain reaction in comparison to the reference strain *P. gingivalis* ATCC33277. As for strain *P. intermedia*, identification was carried out by the MALDI-TOF/MS methods.

Antimicrobial tests

To investigate the antibacterial activity of plants extracts, we used the disc and agar diffusion methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC).

Highlighting antibacterial activity of plant extracts by disc methods

Discs of sterile absorbent paper (9 mm diameter) were soaked with different plant extracts (25 µl). Discs of negative controls were soaked with sterile distilled water, whereas discs containing different reference antibiotics served as positive controls. Columbia agar (20 ml) boxes are seeded on the surface with a swab of a bacterial suspension of 0.5 Mc Farland. The paper disc was placed in the middle of the seeded Petri dish. Petri dishes were incubated at 37 °C for 5 days (Mbata et al. 2008). Radial diffusion of the aqueous extract from the disc. Formation of a concentration gradient by inhibiting microbial growth. This inhibition is represented by a clear zone.

After incubation, result reading is made by measuring diameters in millimeters of the inhibition areas. As much inhibition zone is large as sensible is the germ. All experiments were carried out in triplicates.

Determination of the MIC by agar diffusion method (M11-A8): The disc diffusion method was performed as described by M11-A8. A serial dilution at ½ of parent concentration in TPP of different extracts of *A. herba-alba*, *C. sinensis*, *P. crinita* and *O. ficus-indica* was also performed.

Label one Petri plate for each dilution (d1, d2, d3 and d4) of the plant extract to be prepared and distribute the plates on a level surface.

For each dilution being prepared, add 1 mL of laked sheep blood and 2 mL of each dilution a tube of melted and cooled

agar containing 17 mL of supplemented Columbia agar. Tighten the cap of the tube and gently invert several times to mix, being careful not to create bubbles. Pour into the Petri plates and allow it to solidify (usually 15–20 min).

For each plant extract tested, prepare one additional plate with no added plant extract. This follows the same procedure as in step 2 above, but substituting sterile, distilled water for the plant extract solution.

After the agar has solidified, dry the plates by placing them with the lids ajar in a laminar flow hood or an incubator for approximately 30 min. Alternatively, invert the plates and prop the agar side against the lid.

Preparation of the inoculum

Select colonies of Columbia agar supplemented with blood. The box should not remain in an aerobic atmosphere for more than 30 min before taking the suspension.

Collect with Pipette Pasteur five or more well-isolated colonies of similar morphology and suspend them directly in the medium A broth to obtain a turbidity equivalent to a concentration of 0.5 Mc Farland.

A total of 0.2 ml of the bacterial suspension is seeded on the surface of the agar. Then, the Petri dishes are incubated at 37 °C for 5 days.

Each dilution (d1, d2, d3 and d4) of the plant extracts (2 ml) was added to the Columbia agar media. After solidification, agar media containing extracts or not (negative control: Extract was replaced by distilled water) were prepared. An aliquot of 0.2 ml of bacterial suspension (in 0.5 Mc Farland) was seeded on the surface of the agar. The Petri dishes were then incubated at 37 °C in anaerobic conditions for 5 days. After incubation, results were recorded by noting the presence or absence of visible bacterial growth. The MIC was defined as the lowest concentration of the plant extract inhibiting bacterial growth. The MICs therefore allowed the measurement of effectiveness of the antibacterial agents.

Results and discussions

Results obtained for the aqueous extracts for antibacterial activity by disc methods show that all extracts present an antibacterial activity against the clinical strains (15 strains of *P. gingivalis* and 20 strains of *P. intermedia*) and the reference strain *P. gingivalis* ATCC 33277, with an efficiency more or less variable according to the nature of the tested extract, the concentration of the later and the tested strains. The use of negative control (distilled water) showed no inhibitory activity, with positive controls showing activity against all of the clinical strains including the reference strains on the control discs.

Diameters of inhibition obtained with each plant's extract and at different concentrations are presented in Table 1 and are expressed as mean \pm standard deviation of three repetitions.

This table shows that aqueous extracts (AqEx1) of *A. herba-alba* presented inhibition's diameters of *P. gingivalis* that varied between 31.83 ± 0.24 and 49.00 ± 0.82 mm for aqueous extract concentration of 7.5–120 mg/ml, which represents a concentration in TPP of 0.058–1.004 EAG mg/ml. These results reflect how effective this plant is against growth inhibition of *P. gingivalis*. Knowing that for dose D1 = 3.75 mg/ml, *P. gingivitis* showed to be resistant.

It is likewise for results obtained with AqEx2 of *O. ficus-indica*, exhibiting diameters of inhibition against *P. gingivalis* varying between 31.17 ± 0.85 and 48.83 ± 1.03 mm, which favors a good antimicrobial activity. As for doses D1, D2 and D3, they did not show antimicrobial activities. Diameters of inhibition obtained for both extracts (1 and 2) did not present significant differences ($P > 0.05$). The study of aqueous extract activity of *C. sinensis* (AqEx3) on *P. gingivalis* showed inhibition zones with diameters between 21.33 ± 2.62 and 42.00 ± 2.62 mm for concentration in leaf extract of 100–400 mg/ml which represents a concentration in TPP of 5.49–5.27 mg EAG/ml. These diameters of inhibition reflect the sensitivity of *P. gingivalis* over this extract. Values of these diameters present a significant difference ($P < 0.05$) with those obtained with AqEx1, but we did not record significant difference with results obtained with AqEx2 ($P > 0.05$). *P. gingivalis* was resistant to doses: D1, D2 and D3.

At last, aqueous extract of *P. crinita* (AqEx4) gave diameters of inhibition ranging from 07.54 ± 0.36 to 10.50 ± 0.41 mm. *P. gingivalis* has been sensitive only for doses D5 and D6. As for doses D1 to D4, the germ revealed to be resistant. The statistical tests show clearly a significant difference between AqEx1 and AqEx2; by contrast, there was no significant difference with AqEx3. The results obtained with the reference strain *P. gingivalis* ATCC33277 for all extracts were similar to those obtained with clinical strains of *P. gingivalis*.

For *P. intermedia*, inhibition diameter values obtained with AqEx1 did not present significant difference with AqEx2, AqEx3 and AqEx4 ($P > 0.05$). It is likewise for AqEx3, where values of inhibition parameters did not present significant differences ($p > 0.05$) when compared to AqEx2 and AqEx 4. By contrast, diameter inhibition values of AqEx2 present a significant difference with AqEx4 ($P < 0.05$). These results suggest higher efficiency for AqEx2 and AqEx3 in the case of *P. intermedia*.

Furthermore, a linear correlation between diameters of growth inhibition zones of both microbial strains tested and aqueous extracts growing concentrations (AqEx) of the four plants studied has been observed and summarized in Fig. 1.

Table 1 Different total polyphenol concentrations of the plant extracts used to determine the MIC for two strains *P. gingivalis* and *P. intermedia*

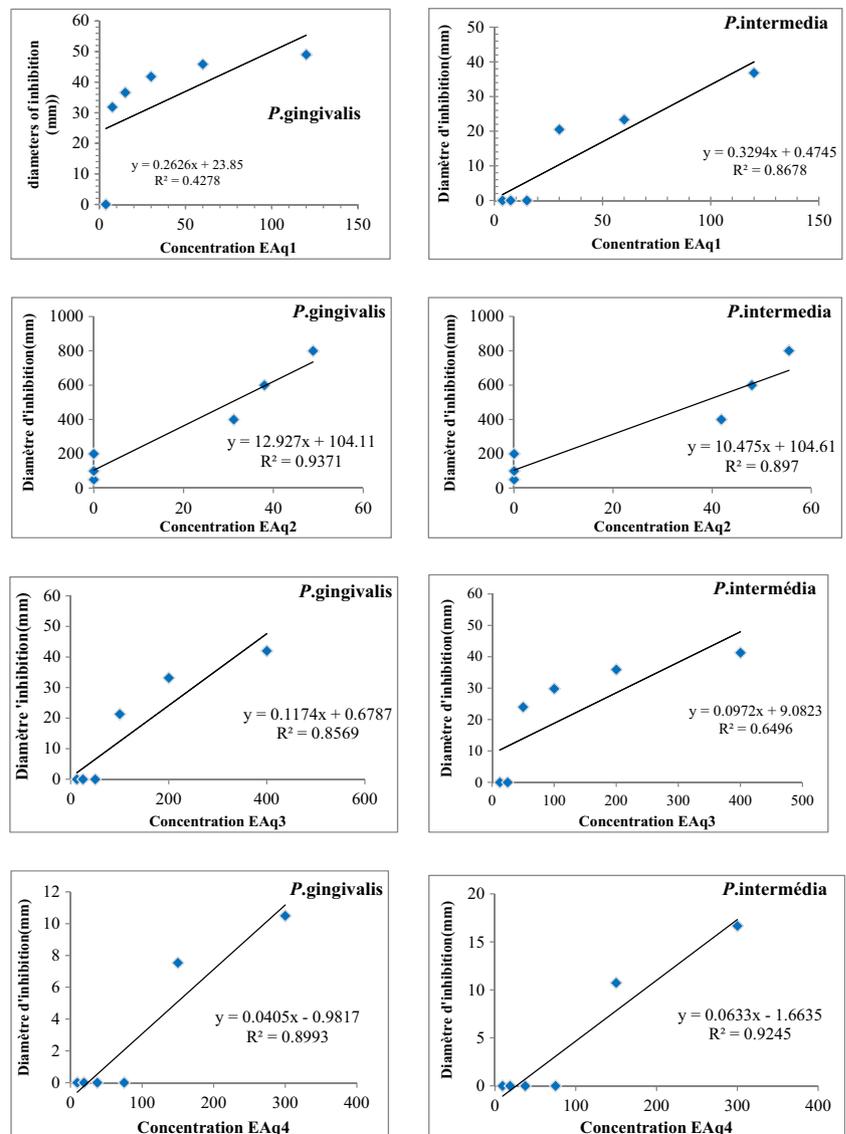
Plant material	Parent sol. of TPP* mg/ml	d1	d2	d3	d4
<i>A. herba-alba</i> (<i>P. gingivalis</i>)	2.32	1.16	0.58	0.29	0.145
<i>A. herba-alba</i> (<i>P. intermedia</i>)	10.04	5.02	2.51	1.255	0.627
<i>P. crinita</i>	11,816.4	5908.2	2954.1	1477.05	738.525
<i>O. ficus-indica</i>	2.4	1.2	0.6	0.3	0.15
<i>C. sinensis</i> (<i>P. gingivalis</i>)	219.6	109.8	54.9	27.45	13.725
<i>C. sinensis</i> (<i>P. intermedia</i>)	83.6	41.8	20.9	10.45	5.225

Parent solution of TPP*: Total polyphenols solution; d1, d2, d3 and d4 dilutions

The coefficient calculation of determination from regression curves under effect of different plant extract concentrations on inhibition zone diameter of clinical strains (Fig. 1) gives a R^2 upper to 0.5 for all plant extracts studied, except the effect of AqEx1 on *P. gingivalis*.

It is noted that the relation between inhibition zones of clinical strains of *P. gingivalis* and plant extract concentration was very strong and proportional, particularly for *P. gingivalis* in the presence of AqEx2 with a $R^2 > 0.8$. Regression curve is therefore significant ($P < 0.05$) for all extracts (AqEx2,

Fig. 1 Regression correlation between diameters of growth inhibition zones of both strains tested and aqueous extracts concentrations (AqEx) of plants studied



AqEx3 and AqEx4) with a good correlation ($R^2 > 0.5$). In turn, relation between diameter of inhibition zone of *P. gingivalis* in the presence of AqEx1 is below the average with a $R^2 < 0.5$; the regression curve is not significant (NS) ($P > 0.05$).

As for clinical strains of *P. intermedia*, the relation of inhibition zones of *P. intermedia* and plant extract concentration was very strong, particularly in the presence of AqEx4, with a $R^2 > 0.9$. For AqEx1 and 2, the $R^2 > 0.8$. As for relation between inhibition zone diameter and concentration of AqEx3, it shows an average with $R^2 > 0.6$. In the case of *P. intermedia*, the regression curve is significant ($P < 0.05$) for AqEx1, 2 and 4 with a good correlation. In turn, the regression curve is not significant (NS) ($P > 0.05$) for AqEx3 with average correlation $R^2 > 0.6$.

Values of statistical analysis of inhibition diameter of all plant extracts show that even if all extracts present an antibacterial activity, AqEx1 and AqEx2 are placed in the first rank in inhibition of *P. gingivalis*; by producing diameters of inhibition, the most important are with values which differ significantly from other extracts studied. In the second place, AqEx2 and AqEx3, with values of inhibition diameters presenting no significant difference, are also revealing a strong efficiency in inhibition of *P. gingivalis*. AqEx4 arrives in the last position, marked by the most important resistance of *P. gingivalis* and *P. intermedia*. In the case of *P. intermedia*, AqEx 2 and 3 appear more effective with important inhibition diameters with values presenting no significant differences ($P > 0.05$).

Comparison of efficiency in each extract according to its concentration, on each of the clinical strains, is represented by a histogram (Fig. 2).

The MIC obtained by agar dilution method is provided in Table 1. They allow estimation of the sensitivity of clinical isolates of *P. gingivalis* and *P. intermedia* for the four plant extracts (AqEx1, AqEx2, AqEx3 and AqEx4) which were 0.058, 590.82, 5.49 and 0.03 mg/ml for *P. gingivalis*; 0.251, 590.82, 2.09 and 0.03 mg/ml for *P. intermedia*; and 0.251, 590.82, 2.09 and 0.03 mg/ml for *P. intermedia*, respectively.

Results show that the strains of *P. intermedia* are generally more sensitive to plant extracts than *P. gingivalis*. A comparative study of different antibiotics and synthetic anti-infectious agents with its microbial strains performed in the same operational conditions is summarized in Table 2. These results show that these strains are not all sensitive to synthetic antibacterial agents, except for certain classical and powerful antibiotics. The results obtained in this study with the aqueous plant extracts show that these natural products are as efficient as the synthetic antibiotics; in addition, they do not provoke harmful impact in long-term use as well-known for green tea.

Interest in medicinal plants (MP) as potential sources of efficient antimicrobial agents has increased over the last several years. Numerous studies have examined antibacterial extracts of several plants. Several MP and their active chemical ingredients are being used in prevention and treatment of oral diseases (Table 3) (Gultz et al. 1998; Fani and Kohanteb 2012).

Our study plants, *A. herba-alba*, *O. ficus-indica*, *C. sinensis* and *P. crinita*, are well known and used extensively in traditional medicine. For example, *O. ficus-indica* is a plant used for its anti-inflammatory effects and analgesic, hypoglycaemic, antiviral and antioxidant properties (Ncibi et al. 2008). *A. herba-alba* (Asteraceae) grows in arid and semiarid climates, is popularly used in Algeria and recognized for its various biological activities such as hypoglycemic, antibacterial, antifungal, anticancer, anti-inflammatory and neuro-protective properties (Bora and Sharma 2011; Laouini et al. 2016). Green tea (*C. sinensis*), a natural source of antimicrobial agents (Sumit Bansal et al. 2013), is subject of several studies due to its richness in polyphenols (particularly the flavonoids such as the catechins) and is well established that the biological activities of green tea are attributed to catechins (Pham-Huy et al. 2008a, b; Derbel and Ghedira 2005; Cooper et al. 2005). Moreover, catechins are well known for their beneficial effects on cancer, cardiovascular diseases, neuro-degenerative diseases and against oral

Fig. 2 Effect of the four extracts (AqEx1, AqEx2, AqEx3 and AqEx4) on growth inhibition of *P. gingivalis* and *P. intermedia*

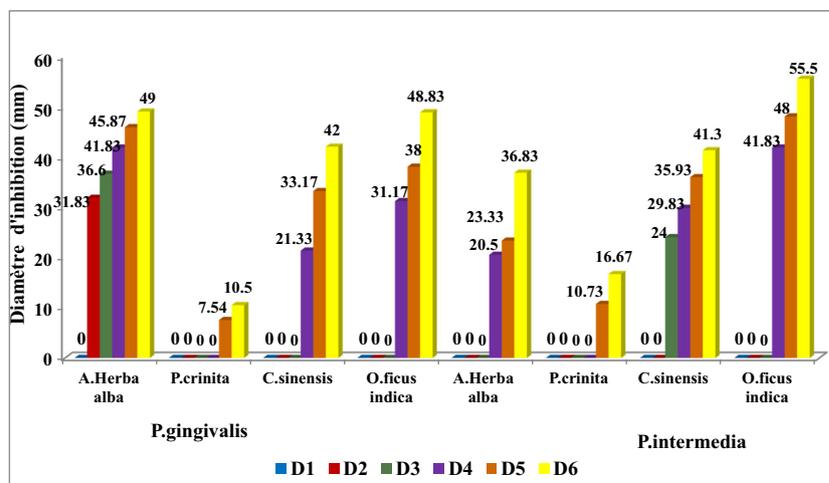


Table 2 The values of the inhibition diameters and the MIC obtained of the different PPT concentrations of the plant extracts used on the two strains *P. gingivalis* and *P. intermedia*

	C_{EAQ} (mg/ml)	C_{TPP} (mg/ml)	<i>P. gingivalis</i> ($n = 20$) (mm)	MIC (mg/ml)	<i>P. intermedia</i> ($n = 20$) (mm)	MIC (mg/ml)
<i>A. herba-alba</i> AqEx1	D1 = 3.75	0.028	R	0.058	R	0.251
	D2 = 7.5	0.058	31.83 ± 0.24		R	
	D3 = 15	0.119	36.60 ± 0.43		R	
	D4 = 30	0.251	41.83 ± 1.43		20.50 ± 1.08	
	D5 = 60	0.498	45.87 ± 0.84		23.33 ± 0.85	
	D6 = 120	1.004	49.00 ± 0.82		36.83 ± 1.31	
<i>O. ficus-indica</i> AqEx2	D1 = 50	2.89	R	0.03	R	0.03
	D2 = 100	8.99	R		R	
	D3 = 200	15.01	R		R	
	D4 = 400	30	31.17 ± 0.85		41.83 ± 1.43	
	D5 = 800	55.9	38.00 ± 0.82		48.00 ± 0.82	
	D6 = 1600	135.26	48.83 ± 1.03		55.50 ± 0.41	
<i>C. sinensis</i> AqEx3	D1 = 12.5	0.59	R	5.49	R	2.09
	D2 = 25	1.01	R		R	
	D3 = 50	2.09	R		24 ± 00	
	D4 = 100	5.49	21.33 ± 2.62		29.83 ± 0.85	
	D5 = 200	9.99	33.17 ± 0.39		35.93 ± 0.82	
	D6 = 400	5.27	42.00 ± 0.41		41.30 ± 0.92	
<i>P. crinita</i> AqEx4	D1 = 9.375	34.99	Resistant	590.82	Resistant	590.82
	D2 = 18.75	71.85	Resistant		Resistant	
	D3 = 37.5	146.7	Resistant		Resistant	
	D4 = 75	280.41	Resistant		Resistant	
	D5 = 150	590.82	07.54 ± 0.36		10.73 ± 0.61	
	D6 = 300	1080.21	10.50 ± 0.41		16.67 ± 1.25	

C_{AqE} aqueous extract concentration, C_{TPP} total polyphenol concentrations, *AqEx* aqueous extract, *D* dose

Table 3 The antibiogram of the two strains *P. gingivalis* and *P. intermedia*

Antibiotics	<i>P. gingivalis</i>		<i>P. intermedia</i>	
	Diameter	Interpretation	Diameter	Interpretation
Penicillin	>40	Sensitive	<06	Resistant
Ampicillin/Amoxicillin	>40	Sensitive	32	Resistant
Ticarcillin	>40	Sensitive	>40	Sensitive
Cefazolin	>40	Sensitive	<06	Resistant
Cefoxitin	>40	Sensitive	40	Sensitive
Cefotaxime	>40	Sensitive	>40	Sensitive
Piperacillin	>40	Sensitive	–	–
Imipenem	>40	Sensitive	>40	Sensitive
Amox + ac.clavulanique	>40	Sensitive	>40	Sensitive
Kanamycin	<06	Resistant	<06	Resistant
Chloramphenicol	–	–	–	–
Tetracycline	>40	Sensitive	31	Sensitive
Erythromycin	>40	Sensitive	<06	Resistant
Clindamycin 15UI	>40	Sensitive	<06	Resistant
Rifampicin	–	–	–	–
Sulfamethoxazole	≤06	Resistant	<06	Resistant
Vancomycin	>40	Sensitive	<06	Resistant
Metronidazole	<40	Resistant	31	Sensitive

pathogens (Pham-Huy et al. 2008a, b). However, in most of the previous studies related to green tea, extraction of polyphenols was essentially made with ethyl alcohol, but in this study, we have studied bactericidal effects of the aqueous extracts for further study due to its relevance to popular use.

The genus *Phlomis* belongs to Lamiaceae family, with over 100 species spread in several continents, such as Europe, Asia and North Africa. The floral parts are often used as infusion to treat gastrointestinal disorders. Some species have been described to protect liver, kidney, heart, veins and bones of different pathologies. *P. crinita* has often been used to treat burns, lesions and skin infections (Ilef Limem-Ben Amor et al. 2009; Boukef 1986; Quezel and Santa 1963).

Essential oils of species in *Phlomis* showed an important bacterial activity (Ilef Limem-Ben Amor et al. 2009) similar to methanolic extracts of certain species of *Phlomis* (*Phlomisbruguieri*, *Phlomis herba-venti*, *Phlomisolivieri*) which have showed a bactericide activity over some bacteria (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus sanguis* and *Pseudomonas aeruginosa*) (Ben-Amor et al. 2009; Morteza-Semnani et al. 2004). The flavonoids are major phytochemicals of *Phlomis* genus. The majority of flavonoids isolated from *Phlomis* are flavones and flavonols such as luteolin-7-glucoside, luteolin-7-O- β -glucopyranoside, chrysoeriol-7-p-coumaroyl glucoside and chrysoeriol-7-glucoside constitute the glycosylated flavonoids found in genus of *Phlomis* (Ilef Limem-Ben Amor et al. 2009; El-Negoumy et al. 1986; Kyriakopoulou et al. 2001; Javid Hussain et al. 2010).

The aqueous extracts of *A. herba-alba*, *O. ficus-indica* and *P. crinita* have, for the first time, been subject of a study on their antimicrobial effect over periodonto-pathogenic bacteria. Aqueous extracts of these plants (AqEx1: aqueous extract of *A. herba-alba*, AqEx2: aqueous extract of *O. ficus-indica*, AqEx3: aqueous extract of *C. sinensis* and AqEx4: aqueous extract of *P. crinita*) have all presented an antibacterial activity variable between them, with different inhibition diameters. These results show existence of natural antimicrobial compounds in all aqueous extracts tested.

P. gingivalis and *P. intermedia* have been selected in this study because periodontal disease is essentially due to the strict anaerobic Gram-negative bacteria. In addition, *P. gingivalis* and *P. intermedia* are often found and isolated in periodontal pockets of patients with advanced periodontitis (Sakanaka and Okada 2004, Palaska et al. 2013). *P. gingivalis* is a highly pathogenic bacterium, which adheres to epithelial cells of the host knowing that bacteria's adherence to host's tissue cells is the first step of bacterial infection. Bacteria, once adhered, begin the settlement and the production of virulence factors causing damage to host's cells (Gibbons 1984; Sakanaka and Okada 2004). According to Sakanaka and Okada 2004, *P. gingivalis* has several virulence factors such as secretion of metabolic

cytotoxic products. These components penetrate easily into the periodontal tissues of the host, due to their low molecular weight causing disruption activity of host's cell.

Inhibiting production of these toxic metabolites and growth's inhibition and cell adhesion of these periodonto-pathogenic bacteria is very important in prevention of periodontal diseases. Hence, inhibition of virulence factors of *P. gingivalis* by green tea polyphenols was reported several times by literature (Sakanaka and Okada 2004). Numerous studies, with respect to oral pathology of humans, show that rinsing the mouth with green tea during 30 s inhibits the bacteria's growth responsible of tooth decay (Pham-Huy et al. 2008a, b; Hirasawa et al. 2006; Cooper et al. 2005; Mc Kay and Blumberg 2002; Ferrazzano et al. 2011). On the whole, experiences on green tea gave promising results for oral-dental health (Pham-Huy et al. 2008a, b; Lolayekar and Shanbhag 2012). In this study, all isolates of *P. gingivalis*, *P. intermedia* and including the reference strain of *P. gingivalis* ATCC3327 were shown to be sensitive to AqEx1, AqEx2, AqEx3 and AqEx4 of *A. herba-alba*, *O. ficus-indica*, *C. sinensis* and *P. crinita*, respectively, with different inhibition diameters.

In the case of *P. gingivalis*, the best results have been allocated to AqEx1 and AqEx2 (*A. herba-alba* and *O. ficus-indica*) due to their strong inhibition marked by important diameters and with MIC of 0.058 mg/ml for the first extract and 0.03 mg/ml for the second one. The sensitivity of *P. gingivalis* over AqEx1 is shown from D2 dose which is 7.5 mg/ml of plant extract representing a concentration of 0.058 mg/ml of TPP. As for D1 dose, the strain showed to be resistant. The sensitivity of *P. gingivalis* over AqEx2 was expressed from D4 dose which represented a concentration of 30 mg/ml of TPP. The bacterium was shown to be resistant for D1, D2 and D3 doses.

The bactericidal activity of AqEx2 (*O. ficus-indica*) can be explained by its composition in bioactive molecules. In fact, numerous authors allocate the benefits of this plant at its components, notably polyphenols and flavonoids known for their wide range of biological activities (Gianmaria F. Ferrazzano et al. 2011). Today, we recognize the bactericidal activity to these molecules, which represents a new source of anti-infectious agents (Gianmaria F. Ferrazzano et al. 2011). Likewise, *Artemisia* (AqEx1) yielded satisfactory results due to its richness in bioactive molecules. In fact, its richness in polyphenols and flavonoids has often been cited in literature (Khlifi et al. 2013). (Khlifi et al. 2013; Djeridane et al. 2006). AqEx3 (*C. sinensis*) proved its efficiency in inhibition of *P. gingivalis*. These results agree with several authors' publications (Pham-Huy et al. 2008a, b; Ferrazzano et al. 2011).

At last, AqEx4 (*P. crinite*) showed to be the less effective, with a maximal inhibition diameter of 10.50 ± 0.41 mm for

P. gingivalis and 16.67 ± 1.25 mm for *P. intermedia*. *P. gingivalis* appears less sensitive than *P. intermedia*. In addition, for both strains, inhibition is shown only at dose D5 and D6. There is no inhibition for other doses, which is probably due to the extraction method, or to the difficulty of antimicrobial agent to disseminate uniformly in agar (S. Athamena et al. 2010).

Inhibition of *P. intermedia* by AqEx 2 and AqEx 3 was highly effective. A very good significant correlation ($p < 0.05$) has been observed by the regression analysis. This explains the link existing between plant extract concentrations, thus in TPP bioactive molecules responsible for bactericidal activity of the plant and values of inhibition zone diameters. While with AqEx3, the correlation is average in spite of its bactericide activity equally important. This can be explained by the character at both qualitative and quantitative of compounds present in the extract because efficacy of a phenolic compound depends on its physico-chemical properties and heterogeneous structure intimately linked to extraction method used (Basli et al. 2012). *P. intermedia* showed to be less sensitive than *P. gingivalis* over AqEx1 and AqEx4. A higher significant correlation ($P < 0.05$) has been observed for both these extracts.

These differences noted during the evaluation of antibacterial power of different extracts may be allocated to several factors, such as nature of plant species and therefore its bioactive molecules, ambient conditions, ecological factors, seasonal variations, extraction methods (Bouterfas et al. 2014; Celiktas et al. 2007; Moreira et al. 2005; Sagdic and Ozcan 2003; Turkmen et al. 2007), extract preparation, solvent used, sensibility of bacteria, extract concentration (Bouterfas et al. 2014; Loziene et al. 2007; Ulukanli and Akkaya 2011) and plant organs used (Natarajan et al. 2005; Bouterfas et al. 2014).

In addition, polyphenols are unstable molecules, are easily oxidized by air and light and consequently can lose all their beneficial properties for health. Likewise, extract preparation may influence the content and availability in polyphenols (Pham-Huy et al. 2008a, b). As for clinical essays, several levels of control of polyphenols in plant extracts before the dosage is imperative. Pharmacokinetic studies are also useful to understand factors influencing the bioavailability and metabolism of polyphenols and, consequently, their biological activities. Clinical and controlled trials are necessary to evaluate effectiveness of polyphenols in human chemoprevention (Pham-Huy et al. 2008a, b). Results of antibiogram illustrated in Table 2 show that the most effective antibiotics are notably the betalactamines and the tetracycline followed by erythromycin and metronidazole (Pham-Huy et al. 2008a, b). These results have revealed that ineffectiveness of some antibiotics, notably kanamycin, sulfametoxazole and metronidazole in growth inhibition of *P. gingivalis*, penicillin, ampicillin/amoxicillin, cefazolin, kanamycin, erythromycin, sulfamethoxazole

and clindamycin 15UI, proved to be ineffective in the growth inhibition of *P. intermedia*.

While under optimal concentrations, aqueous extracts of *A. herba-alba*, *Camelia sinensis* and *O. ficus-indica* have been highly effective in the growth inhibition of both strains implicated in periodontal disease. These results suggest use of plant extracts in periodontitis prevention, knowing that these natural products possess advantage to have no long-term harmful effect; as example, the Green Tea, a popular drink, is highly consumed all over the world. In addition, considering the possible evolution of multi-resistant oral bacteria and appearances of secondary effects after use of antibiotics, the natural phytochemical molecules isolated from medicinal plants may be considered as alternative in prevention of oral pathology. A lot of medicinal plants begin to be used for prevention and treatment of oral diseases (Fani and Kohanteb 2012).

Conclusion

The results obtained in this study are very promising. In fact, all plant extracts studied here (*A. herba-alba*, *C. sinensis*, *O. ficus-indica* and *P. crinita*) have varied degrees of inhibition of both strict anaerobic Gram-negative strains which are *P. gingivalis* and *P. intermedia*, mainly responsible in development of aggressive and chronic periodontitis in human. A comparative study with antibiotics show that plant extracts studied are also powerful as compared to synthetic antibiotics against *P. gingivalis* but are relatively stronger than these drugs on *P. intermedia*. By contrast, these natural products are a little toxic or non-toxic and can be used in the long-term treatment, as for the case of Green Tea. A clinical study is necessary in order to confirm the health benefits of these plant extracts in periodontal disease prevention.

Acknowledgements The authors would like to thank the DGRSDT/MESRS Algeria for financially supporting this research.

References

- Alimi H, Hfaeidh N, Bouoni Z, Sakly M, Ben Rhouma K (2013) Ameliorative effect of *Opuntia ficus indica* juice on ethanol-induced oxidative stress in rat erythrocytes. *Experimental Toxicol Pathol* 65:391–396
- Anagnostou F, Itri Jazouli L, Cohen N, Azogui-Lévy S (2011) Maladies parodontales et état de santé général. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), traité de médecine Akos. 7–1104.
- Araghizadeh A, Kohanteb J, Fani MM (2013) Inhibitory activity of green tea (*Camellia sinensis*) extract on some clinically isolated cariogenic and periodontopathic bacteria. *Med Princ Pract* 22:368–372
- Athamena S, Chalghem I, Kassah-Laouar A, Laroui S, et Khebrri S (2010) Activite anti-oxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum* L. *Lebanese Sci J* 11:69–81.

- Bansal S, Choudhary S, Sharma M, Kumar SS, Lohan S, Bhardwaj V, Syan N, Jyoti S (2013) Tea: a native source of antimicrobial agents. *Food Res Int* 53:568–584
- Bargougui A, Champy P, Triki S, Bories C, Le Pape P, Loiseau PM (2014) Antileishmanial activity of *Opuntia ficus-indica* fractions. *Biomedicine Prevent Nutr* 4:101–104
- Basli A, Chibane M, Madani K, Oukil N (2012) Activité antibactérienne des polyphénols extraits d'une plante médicinale de la flore d'Algérie: *Origanum glandulosum* Desf. *Phytothérapie* 10:2–9
- Beck JD, Offenbacher S (1998) Oral health and systemic disease : periodontitis and cardiovascular disease. *J Dent Educ* 62:859–870
- Beck J, Garcia R, Heiss G, Vokanas PS, Offenbacher S (1996) Periodontal disease and cardiovascular disease. *J Periodontol* 67: 1123–1137
- Ben-Amor IL, Boubaker J, Ben Sgaier M, Skandrani I, Bhouiri W, Neffati A, Kilani S, Bouhleb I, Ghedira K, Chekir-Ghedira L (2009) Phytochemistry and biological activities of *Phlomis* species. *J Ethnopharmacol* 125:183–202
- Betatache H, Aouabed A, Drouiche N, Lounici H (2014) Conditioning of sewage sludge by prickly pear cactus (*Opuntia ficus Indica*) juice. *Ecological Eng* 70:465–469
- Boizot N, Charpentier JP (2006) Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier des Techniques de l'Inra Numéro spécial*:79–82
- Bora KS, Sharma A (2011) Evaluation of antioxidant and free radical scavenging potential of *Artemisia absinthium*. *Pharm Biol* 49: 1216–1223
- Boukef MK, (1986) Les plantes dans la médecine traditionnelle tunisienne. Ed. Agence de Cooperation Culturelle et Technique. 92: 9028–085-9.
- Bouterfas K, Mehdadi Z, Latreche A, Aouad L (2014) Pouvoir antimicrobien des flavonoïdes extraits des feuilles de *Marrubium vulgare* L. en provenance du mont de Tessala (Algérie occidentale). *Phytothérapie* 12:6–14
- Celiktas OY, Kocabas EEH, Bedir E, Vardar Sukan F, Ozek T, Baser KHC (2007) Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chem* 100:553–559
- Chardin H, Barsotti O, Bonnaure-Mallet M (2006) Microbiologie odonto-stomatologie. Maloine, Paris, pp 256–259
- Cicco N, Lanorte MT, Paraggio M, Viggiano M, Lattanzio V (2009) A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchem J* 91:107–110
- Cooper R, Morrè DJ, Morrè DM (2005) Medicinal benefits of green tea: part I. Review of noncancer health benefits. *J Altern Complement Med* 11:3521–3528
- Dashiff A, Kadouri DE (2011) Predation of oral pathogens by *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J. *Mol Oral Microbiol* 26:19–34
- Derbel S, Ghedira K (2005) Les phytonutriments et leur impact sur la santé. *Phytothérapie* 1:28–34
- 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* 97:654–660
- El-Negoumy SI, Abdalla MF, Saleh NAM (1986) Flavonoids of *Phlomis aurea* and *P. floccosa*. *Phytochemistry* 25:772–774
- Fani M, Kohanteb J (2012) Inhibitory activity of *Aloe vera* gel on some clinically isolated cariogenic and periodontopathic bacteria. *J Oral Sci* 54:15–21
- Fedala N, Lounici H, Drouiche N, Mameri N, Drouiche M (2015) Physical parameters affecting coagulation of turbid water with *Opuntia ficus-indica* cactus. *Ecological Eng* 77:33–36
- Ferrazzano GF, Amato I, Ingenito A, Zarrelli A, Pinto G, Pollio A (2011) Plant polyphenols and their anti-cariogenic properties: a review. *Molecules* 16:1486–1507
- Filoche S, Wong L, Sissons CH (2010) Oral biofilms: emerging concepts in microbial ecology. *J Dent Res* 89:8–18
- Gibbons RJ (1984) Adherent interactions which may affect microbial ecology in the mouth. *J Dent Res* 63:378–385
- Grenier D, Mayrand D (2000) Periodontitis as an ecological imbalance. In: Kuramitsu HK, Ellen RP (eds) *Oral bacterial ecology: the molecular basis*. Horizon Scientific Press, Wymondham, United Kingdom, pp 275–310
- Gultz J, Kaim JM, DeLeo J, Scherer W (1998) An in vivo comparison of antimicrobial activities of three mouthrinses. *J Clin Dent* 9:43–45
- Hirasawa M, Takada K, Otake S (2006) Inhibition of acid production in dental plaque bacteria by green tea catechins. *Caries Res* 40:265–270
- Horz HP, Conrads G (2007). Diagnosis and anti-infective therapy of periodontitis. *Expert Rev Anti infect Ther* P-703-715.
- Houle MA, Grenier D (2003) Maladies parodontales: connaissances actuelles. *Current concepts in periodontal diseases. MédMaladies Infectieuses* 33:331–340
- Hussain J, Bukhari N, Hussain H, Bano N, Naeem A, Green IR (2010) Flavonoids and terpenoids from *Phlomis cashmeriana* and their chemotaxonomic significance. *Rec Nat Prod* 4:242–249
- Jhajharia K, Parolia A, Shetty KV, Mehta LK (2015) Biofilm in endodontics: a review. *J Int Soc Prev Community Dent* 5:1–12
- Kabouche A, Kabouche Z, Seguin E, Tillequin F, Bruneau C (2004) Comparative phytochemical study of the butanolic extracts of two Algerian *Phlomis* species. *Chem Natural Compounds* 40:188–189
- Khlifi D, Sghaier RM, Amouri S, Laouini D, Hamdi M, Bouajila J (2013) Composition and anti-oxidant, anti-cancer and anti-inflammatory activities of *Artemisia herba-alba*, *Ruta chalapensis* L. and *Peganum harmala* L. *Food Chem Toxicol* 55:202–208
- Kyriakopoulou I, Magiatis P, Skaltsounis AL, Aligianis N, Harvala C (2001) Samioside, a new phenylpropanoid glycoside with free radical scavenging and antimicrobial activities from *Phlomis samia*. *J Natl Prod* 64:1095–1097
- Laouini S-E, Redha OM, Ladjel S (2016) Influence of solvent extraction on phenolic content, antioxidant and anti-inflammatory activities of aerial parts extract from Algerian *Artemisia herba-alba*. *J Pharm Res* 10:58–64
- Limem-Ben Amor I, Boubaker J, Ben Sgaier M, Skandrani I, Bhouiri W, Neffati A, Kilani S, Bouhleb I, Ghedira K, Chekir-Ghedira L (2009) Phytochemistry and biological activities of *Phlomis* species. *J Ethnopharmacol* 125:183–202
- Lolayekar N, Shanbhag C (2012) Polyphenols and oral health. *RSBO* 9(1):74–84 **2012 Jan-Mar**
- Loziene K, Venskutonis PR, Sipailienė A, Labokas J (2007) Radical scavenging and antibacterial properties of the extracts from different *Thymus pulegioides* L. chemotypes. *Food Chem* 103:546–559
- Mak JC (2012) Potential role of green tea catechins in various disease therapies: progress and promise. *Clin Ex Pharmacol Physiol* 39: 265–273
- Mbata TI, Debiao LU, Saikia A (2008) Antibacterial activity of the crude extract of Chinese green tea (*Camellia sinensis*) on *Listeria monocytogenes*. *African J Biotechnol* 7:1571–1573
- Mc Kay DL, Blumberg JB (2002) The role of tea in human health: an update. *J Am Coll Nutr* 21:1–13
- Mighri H, Hajlaoui H, Akrou A, Najjaa H, Neffati M (2010) Antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia herba-alba* essential oil cultivated in Tunisian arid zone. *Comp Rendus Chimie* 13:380–386
- Mohamed AEH, El-Sayed MA, Hegazy ME, Helaly SE, Esmail AM, Mohamed NS (2010) Chemical constituents and biological activities of *Artemisia herba-alba*. *Rec Nat Prod* 4(1):1–25
- Moreira MR, Ponce AG, Del Valle CE, Roura SI (2005) Inhibitory parameters of essential oils to reduce a food borne pathogen. *LWT Food Sci Technol* 38:565–570

- morteza-Semnani K, Azadbakht M, Goodarzi A (2004) The essential oils composition of *PHLOMIS HERBA-VENTI* L. leaves and flowers of Iranian origin. *FLAVOUR FRAGRANCE J* 19:29–31
- Nagano K, Hasegawa Y, Yoshida Y, Yoshimura F (2015) A major fimbriin variant of Mfa1 fimbriae in *Porphyromonas gingivalis*. *J Dent Res* 94:1143–1148
- Natarajan D, Britto SJ, Srinivasan K, Nagamurugan N, Mohanasundari C, Perumal G (2005) Anti-bacterial activity of *Euphorbia fusiformis*: a rare medicinal herb. *J Ethnopharmacol* 102:123–126
- Ncibi S, Ben Othman M, Akacha A, Krifi MN, Zourgui L (2008) *Opuntia ficus indica* extract protects against chlorpyrifos-induced damage on mice liver. *Food Chem Toxicol* 46:797–802
- Palaska I, Papathanasiou E, Theoharides TC (2013) Use of polyphenols in periodontal inflammation. *Eur J Pharmacol* 720(1–3):77–83
- Palmer, RJ Jr (2014) Composition and development of oral bacterial communities. *Periodontol* 2000 64(1):20–39
- Pham-Huy LAN, He H, Pham-Huy C (2008a) Green tea and health: an overview. *J Food Agricul Environ* 6(6–1):3
- Pham-Huy LAN, He H, Pham-Huy C (2008b) Green tea and health: an overview. *J Food, Agricul Environ* 6:6–1 3
- Quezel P, Santa S (1963) Nouvelle flore de l'Algérie et des régions desertiques et meridionales. Tome II. Editions CNRS, Paris
- Sagdic O, Ozcan M (2003) Antibacterial activity of Turkish spice hydro-sols. *Food Control* 14:141–143
- Sakanaka S, Okada Y (2004) Inhibitory effects of green tea polyphenols on the production of a virulence factor of the periodontal-disease-causing anaerobic bacterium *Porphyromonas gingivalis*. *J Agri Food Chem* 52:1688–1692
- Tamert A, Latreche A (2016) Antioxidant activity of extracts of six aromatic Lamiaceae of Western Algeria. *Phytothérapie* DOI. doi:10.1007/s10298-015-1016-1
- Tsai T-H, Tsai T-H, Chien Y-C, Lee C-W, Tsai P-J (2008) *In vitro* anti-microbial activities against cariogenic streptococci and their antioxidant capacities: a comparative study of green tea versus different herbs. *Food Chem* 110:859–864
- Turkmen N, Sari F, Velioglu YS (2006) Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin–Ciocalteu methods. *Food Chem* 99:835–841
- Turkmen N, Velioglu YS, Sari F, Polat G (2007) Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea. *Molecules* 12:484–496
- Ulukanli Z, Akkaya A (2011) Antibacterial activities of *Marrubium catarifolium* and *Phlomis pungens* var. *Hirta* grown wild in Eastern Anatolia, Turkey. *Int J Agric Biol* 13:1560–8530
- Zarco MF, Vess TJ, Ginsburg GS (2012) The oral microbiome in health and disease and the potential impact on personalized dental medicine. *Oral Dis* 18:109–120