



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Echahid Cheikh Larbi Tébessi –Tébessa-



Faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie

Département : Biologie appliquée

MEMOIRE DE MASTER

Domaine: Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences biologique

Option : Biologie moléculaire et cellulaire

Thème :

**Etude des propriétés biologiques d'une plante
médicinale caractéristique de la région de
Tébessa : Chardon marie (*Silybum marianum*)**

Présenté par :

M^{elle} Nour Elhouda BOUTERAA

M^{elle} Amira SMATI

Devant le jury :

Ziani Saoussen
Smaali Saoussene
Chadi Hafidha
Mesbahi malak

MAA Université de Larbi Tébessi
MCA Université de Larbi Tébessi
MAA Université de Larbi Tébessi
Doctorante Université de Larbi Tébessi

Présidente
Promotrice
Examinatrice
Co-Promoteur

Date de soutenance : 07-06-2023

Année Universitaire : 2022-2023

Note: /20

Mention:



DEDICACE

Louange à Allah tout puissant, qui m'a permis de voir ce jour tant attend
A mon très cher père **Abdelouahab**, grâce à toi papa j'ai appris le sens du travail et de la responsabilité. Je voudrais te remercier pour ton amour, ta générosité, ta compréhension...

Ton soutien fut une lumière dans tout mon parcours. Aucune dédicace ne saurait
exprimer l'amour l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour toi
A Ma chère mère **Fatiha**, qui m'a donné la vie qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études.

Qu'ALLAH vous protège et donne la santé, le bonheur et longue vie.
A mes chères sœurs : **Soumeya** et son marie **Kamal** et **Dhikra** que j'aime beaucoup pour l'amour qu'elles me réservent je leurs souhaite une vie pleine du bonheur et de succès

A mes chers frères : **Katib, Ramzi** et **Abderraouf**
Aucune dédicace ne peut exprimer mon amour et ma gratitude de vous avoir comme sœurs et frères, Je ne pourrais jamais imaginer la vie sans vous, vous comptes énormément pour moi.

A la petite fille de la famille, à celle qui me motive quand je perds la passion, à celle qui a le doux sourire **Bibia (Narimane)**, je vous souhaite le bonheur et la réussite dans une vie pleine d'amour et tout le meilleur. **Sarangi !**

Au petit ange de ma famille « **Maria Miras** ».

A toute la famille et à tous ceux qui ont prié pour moi en secret
A chaque être cher qui nous manque et il n'est pas avec nous
A mes chères amies : **Hana, Nessrine**. En souvenir des moments heureux passés ensemble, avec mes vœux sincères de réussite, bonheur, santé et de prospérité.

A mon binôme et ma sœur **NouR** pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension .Je te souhaite tous le bonheur et de la joie dans votre vie chérie.

A toute la famille de mon binôme **BOUTERAA**.

AMIRA

REMERCIEMENTS

Avec nos sentiments de gratitude les plus profonds

Nous remercions Allah, tout-puissants pour son aide et le courage qui nous a données pour surmonter toutes les difficultés durant notre étude et la patience de terminer ce modeste travail.

*Au **Dr Smaali S**, notre directrice de mémoire, merci de nous avoir guidées et soutenues tout au long de la réalisation de ce mémoire. Votre réactivité et votre disponibilité ont été d'une grande aide, ainsi pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'elle a bien voulu nous consacrer et sans elle ce mémoire n'aurait jamais vu le jour. Merci*

*A **Melle Mesbahi M**, notre co-encadreur, votre aide, vos conseils et votre disponibilité ont été d'une grande aide pour nous, Merci*

*Nous remercions les membres du jury : **Mme Ziani S. et Mme Chadi H** pour leurs acceptations de juger notre modeste travail.*

*Au sein du laboratoire de faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie, nous tenons à remercier : les techniciennes de laboratoire **Iman** et **Karima** pour notre aide, notre soutien, et son dévouement au travail,*

*Et un grand merci, au **Dr Boukoucha** pour ses conseils.*

Enfin, ne pouvant citer tous ceux et celles qui nous ont aidées de près ou de loin d'un, nous leur adressons nos remerciements les plus sincères.

RESUME

L'objectif principal de cette étude est d'extraire des composants bioactifs de chardon marie par deux méthodes (aqueuse, méthanolique) à partir des feuilles et les fleurs afin de déterminer l'activité antimicrobienne leurs activités contre les micro-organismes pathogènes.

Cette étude vise également à déterminer le taux de composés phénoliques totaux dans les deux types d'extraits.

Les résultats ont montré que le rendement le plus élevée a été marqué avec l'extrait méthanolique des feuilles ($22,4 \pm 8,51$ %), tandis que le rendement le plus faible a été ($11,47 \pm 9,64$ %) pour l'extrait méthanolique des fleurs. L'extrait méthanolique de fleur a comporté la plus grande concentration de composés phénoliques avec une valeur de ($4,74 \pm 0,381$ mg/ml) et la quantité la plus faible a été marqué dans l'extrait aqueux des feuilles ($1,65 \pm 0,346$ mg/ml). L'activité antimicrobienne des extraits a été marqué principalement sur les souches d'*Entérobactérie* ; *SCN 02* ; *Candida 02* avec 40 ± 00 mm de diamètre, *E. coli*; *SCP*; *Candida 01* ont été affectée par l'extrait aqueux et méthanolique des fleurs avec 40 mm et 28 mm respectivement. Les souches de *Pseudomonas* ont été les moins sensibles aux extraits avec un diamètre qui ne dépassant pas 8 mm.

Enfin, on conclut que les extraits méthanoliques ont eu un effet plus important que les extraits aqueux.

Mots clés : chardon-Marie, extrait aqueux, extrait méthanolique, activité antimicrobienne, composants phénoliques.

ملخص

ينتمي نبات الشوكي او شوك الحليب الى عائلة النباتات النجمية الأكثر استعمالا في الطب التقليدي في العالم. ان الهدف الرئيسي من هذه الدراسة هو استخلاص المركبات النشطة للنبات الشوكية باستعمال طريقتين (المائية ,الميثانولية) للاوراق و الازهارو ذلك لدراسة النشاط المضاد للمكروبات لكل من المستخلص المائي و الميثانولي ضد الكائنات الحية الدقيقة المسببة للأمراض .

كما تهدف هذه الدراسة ايضا لتحديد مستوى اجمالي مركبات الفينول في المستخلصات المائية والميثانولية لشوك الحليب، حيث اوضحت النتائج أن أعلى مردود كان في مستخلص اوراق النبات الشوكي الميثانولي هي $8.51 \pm 2.4\%$ في حين كان ادنى مردود في المستخلص الميثانولي للأزهار $11.47 \pm 9.64\%$.

كما كشفت النتائج ان مستخلص الازهار الميثانولية يحتوي على أعلى كمية من مركبات الفينول بقيمة (4.74 ± 0.381 مغ/مل) وادنى كمية عند مستخلص الاوراق المائي (1.65 ± 0.346 مغ/مل).

و قد أظهرت لنا دراسة النشاط المضاد للمكروبات ان مستخلصات النبات الشوكي المدروسة المخففة بنسبة 50%، أثرت تأثيرا قويا على *Entérobactérie*، *Candida 02*، *SCN 02* بقطر يعادل (40 ± 00 مم) . اما بالنسبة لكل من (*EColi* ، *SCP*؛ *Candida 01*) لم يكن هناك اي تأثير للمستخلص أما بالنسبة لـ *Pseudomonas* تأثرت بمستخلصات الأزهار المائي 40مم والميثانولي 28مم، كما بينت لنا النتائج ان تأثير المستخلص كان ضعيفا على *Klebsiela* بقطر لا يتجاوز 8مم، بينما كان تأثير المستخلص الميثانولي للأزهار على *SCN 01* (11 ± 1.41 مم/مل) و المائي (13.25 ± 1.77 مم/مل) والمستخلص الميثانولي للأوراق (14 ± 00 مم) كان له تأثير جيد لكنها لم تتأثر بالمستخلص المائي للأوراق. وظهرت نتائج تخفيف المستخلص بنسبة 25% *Candida 02* تأثرت تأثيرا قويا بمستخلص شوك الحليب وفي الاخير نستنتج ان مستخلص النبات الشوكي الميثانولي كان له تأثير اكبر من المستخلص المائي.

الكلمات المفتاحية : شوك الحليب- مستخلص مائي-مستخلص ميثانولي – نشاط مضاد للمكروبات- مركبات الفينول.

ABSTRACT

Silybum marianum, or milk thistle, belongs to the Asteraceae family and is one of the plants used in traditional medicine and the most widely used in the world.

The main objective of this study is to extract the plant in two ways (aqueous and methanolic) from plant parts (leaves and flowers) to determine the anti-microbial activity of both aqueous and methanolic extracts against the microorganisms that cause disease.

This study also aims to determine the total level of phenol compounds in aqueous and methanol extracts of milk thistle.

The results showed that the highest yield was in the methanolic extract of leaves (22.4 ± 8.51 %), while the lowest amount was in the methanolic extract of flowers (11.47 ± 9.64 %).

The results revealed that the methanol flower extract contains the highest amount of phenolic compounds of value (4.74 ± 0.381 mg/ml) at the aqueous leaf extract (1.65 ± 0.346 mg/ml).

A study of antibacterial activity showed that 50% of the studied spine extracts strongly affected *Candida 02*, and *Enterobacter SCN 02* by diameter (40 ± 00 m).

For both of them (*E. coli*, SCP; *Candida 01*), there was no trace of the extract; for *Pseudomonas*, it was affected by aqueous flower extract 40 mm and methanol 28 mm, and the results showed us that the extract was weak on *Klebsiella* in a country not exceeding 8 mm, while for *SCN 01* (11 ± 1.41 mm/ml), aqueous (13.25 ± 1.77 mm/ml), and methane extract for leaves (14 ± 00), it had a good effect but it was not affected by the aqueous extract of the leaves.

The dilution results of 25% *Candida 02* were strongly influenced by the milk thistle extract.

Finally, we conclude that the methanolic extract had a greater effect than the aqueous extract.

Keywords: Milk thistle – Aqueous extract- methanolic extract- activity antibacterial- phenol compounds

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Activités biologiques des composés actifs.....	9
Tableau 2 : Les souches utilisées.....	15
Tableau 3 : Présentation des rendements (moyen±ecart type) des extraits de Chardon Marie	21
Tableau 4 : Polyphénols totaux dans les quatre extraits de Silybum marianum (L.)	22
Tableau 5 : Présentation des moyennes de diamètre de la zone d'inhibition (Moy±Ect) en mm des extraits 50%	24
Tableau 6 : Présentation des moyennes de diamètre de la zone d'inhibition (Moy±Ect) en mm des extraits 25%	27
Tableau 7 : Présentation des moyennes de diamètre de la zone d'inhibition (Moy±Ect) en mm des extraits 12.5%	29

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Morphologie de tige de plante chardon marie	5
Figure 2 : Morphologie de racine de plant chardon marie	5
Figure 3 : Morphologie de feuille de plant chardon marie.	6
Figure 4 : Morphologie de Fleur	6
Figure 5 : Morphologie des fruits de plant chardon marie.	7
Figure 6 : Structure chimique des composés de flavonolignane	8
Figure 7 : Photos originales de chardon marie feuilles et fleures.....	13
Figure 8 : Photos originales du feuilles et fleurs de chardon marie sèches.	14
Figure 9 : Photos originales des feuilles et fleurs de Chardon Marie broyés.	14
Figure 10 : Photos originales de protocole d'extraction aqueux.....	15
Figure 11 : Photo original de rotavap lors de vaporisation des solvants.....	16
Figure 12 : Photos originales des étapes de l'aromatogramme.	18
Figure 13 : Photo originale de spectrophotomètre lors de la lecture d'absorbance en 765nm. 19	
Figure 14 : Protocole de dosage des phénols totaux.....	20
Figure 15 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.	22
Figure 16 : Zone d'inhibition des bactéries à Gram positif	24
Figure 17 : Zone d'inhibition des bactéries à Gram négatif	25
Figure 18 : Zone d'inhibition des champignons	25
Figure 19 : Zone d'inhibition des bactéries à Gram positif	27
Figure 20 : Zone d'inhibition des bactéries à Gram négatif.	28
Figure 21 : Zone d'inhibition de levure	28
Figure 22 : Zone d'inhibition des bactéries à Gram négatif	29
Figure 23 : Zone d'inhibition des bactéries à Gram positif	29
Figure 24 : Zone d'inhibition de levure	30

LISTE DES ABREVIATIONS

AG : Acide gallique.

Ect : Ecart type.

EAF : Extrait aqueuse des feuilles.

EAF_L : Extrait aqueuse des fleurs.

EMF : Extrait méthanolique des feuilles.

EMF_L : Extrait méthanolique des fleurs.

EX : Extrait.

GN : Gélose nutritive.

MH : Gélose Muller- Hinton.

Moy : Moyen.

MV : Matériel végétal.

Na Cl : Chlorure de sodium.

RFC : Réactif Folin- Ciocalteu.

SCN : Staphylococcus coagulase négatif.

SCP : Staphylococcus coagulase positif.

TABLE DE MATIERE

Dedicace.....	i
اهتمام.....	ii
Remerciements	iii
Résumé.....	iv
ملخص	v
Abstract.....	vi
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures	viii
Liste des abreviations.....	ix
Table de matière.....	x
Introduction.....	1
Partie bibliographie.....	3
I. Généralité sur chardon marie.....	4
1. Présentation de la plante	4
2. Taxonomie	4
3. Morphologie de la plante	5
4. Caractéristiques botaniques	7
5. Composition chimique du Chardon Marie.....	8
6. Caractéristiques biologiques	9
Partie expérimentale.....	12
II. Cadre d'étude.....	13
III. Matériels et méthodes	13
1. Matériel végétal	13
1.1. Récolte de la plante.....	13
1.2. Séchage et broyage	14
2. Matériel biologique	14
3. Préparation des extraits.....	15
3.1. Extrait aqueux.....	15
3.2. Extraction hydro-méthanolique	15
3.3. Evaporation des solvants	16
4. Calcule de rendements des extractions	16

5.	Activité antimicrobienne des extraits.....	17
5.1.	Méthode de diffusion sur disques (aromatogramme).....	17
5.2.	Préparation des inoculums.....	17
5.3.	Application des disques des extraits.....	17
6.	Dosage des polyphénols totaux.....	18
6.1.	Technique de dosage.....	19
7.	Analyse statistiques.....	19
IV.	Résultats et discussion	21
1.	Rendements d'extraction	21
2.	Dosage des polyphénols totaux.....	22
1.	Evaluation de l'activité antibactérienne.....	24
	Conclusion	32
	Références bibliographiques.....	33
	Annexe	

INTRODUCTION

Le problème de santé mondial de la résistance aux antibiotiques des micro-organismes pathogènes devient de plus en plus important. Par conséquent, il est devenu nécessaire de développer des moyens d'inhiber la croissance des bactéries (OMS, 2020).

Les plantes médicinales sont une source majeure de produits utilisés en médecine alternative. L'utilisation des plantes comme médicament est reconnue pour sa simplicité, son efficacité et ses bienfaits incontestables. Ainsi, on peut prendre soin de soi avec les plantes et bénéficier de leurs propriétés préventives et curatives. Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), environ 65% des personnes utilisent la médecine traditionnelle (Nunes et al, 2020).

Outre le fait que les plantes médicinales sont riches en principes actifs, elles sont également riches en composés phénoliques très utilisés en médecine comme agents protecteurs, anti-inflammatoires, antibiotiques, antiseptiques et diurétiques, mais surtout comme antioxydants pour lutter contre le stress oxydatif (Nunes et al, 2020).

L'Algérie possède une flore extrêmement riche et variée représentée par des plantes aromatiques et médicinales dont la plupart existe à l'état spontané. La valorisation de ces plantes demeure un domaine de grande importance pour le pays. (Bouzabata, 2015).

Cependant, de nombreuses espèces aromatiques et médicinales comme celles appartenant à la famille des Astéraceae nous voulions étudier propriétés biologiques d'une plante médicinale caractéristique notre choix s'est porté sur la plante : chardon marie (*Silybum marianum*).

Afin d'obtenir un diplôme de Master 2 en Biologie moléculaire et cellulaire, nous avons mené une étude entre février 2023 et mai 2023 dans les laboratoires de la Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université d'Echahid Larbi Tébessi de Tébessa, sur l'étude des propriétés biologiques d'une plante de Chardon marie (*Silybum marianum*).

Les objectifs de cette étude étaient les suivants :

- Evaluer les rendements en extraits aqueux et méthanolique des feuilles et fleurs de plante médicinale *Silybum marianum*(L) ;
- Mettre en évidence l'activité antimicrobienne des extraits aqueux et méthanoliques de *Silybum marianum* (L) contre des microorganismes pathogènes ;

- Déterminer le taux des phénols totaux dans les extraits méthanoliques et aqueux de Chardon Marie.

Pour cela, nous avons organisé notre travail en deux parties :

- ✚ La partie I : comprend une partie bibliographique sur chardon marie ; sa taxonomie, ces caractéristiques botaniques, leur composition chimique et leurs activités biologiques.
- ✚ La partie II : représente la méthodologie de notre travail ainsi la présentation des résultats obtenus, la discussion et enfin une conclusion.

Partie bibliographie

I. Généralité sur chardon marie

1. Présentation de la plante

Silybum marianum(L) aussi connue sous le nom de Chardon-Marie, *Carduus Marianus* ou Chardon de lait méditerranéen, appartient à la famille des *Asteraceae*. Cette plante bisannuelle présente des feuilles vert pâle brillantes avec des nervures blanches et des fleurs allant du rouge au violet. Elle est également appelée Mary Thiqhal dans les pays perses et arabes. *Silybum marianum* (L.) peut atteindre une hauteur de 200 cm avec des tiges droites et des branches peu ramifiées. Les feuilles de cette plante sont grandes et ont des taches blanches autour des nervures, et elles sont lobées ou pennées avec des bords épineux. Les capitules mesurent jusqu'à 12 cm de long et de large, et sont de couleur rouge-violet. (Guemari, 2022).

2. Taxonomie

Les différentes appellations de la plante en français, arabe, berbère, anglais et allemands sont les suivants (Benchachouaa, 2019) :

- Noms vernaculaires en français : Chardon-Marie, artichaut sauvage, chardon argenté, chardon Notre-Dame, chardon marbré, épine blanche, lait de Notre-Dame, silybe de Marie ;
- Noms vernaculaires en arabe : Chouk el Djamel, boq, guemih ;
- Noms vernaculaires en targui ou berbère : Tawra;
- Noms vernaculaires en anglais: Milk thistle, Holy thistle, Lady's thistle, Marian thistle, Mary thistle, Silybum, Blessed milk thistle, Mediterranean milk thistle, variegated thistle ;
- Noms vernaculaires allemands : Mariendistel.

Le chardon –Marie (*Silybum marianum*) est une espèce de plantes de la famille des *astéracées*, seul représentant connu du genre *Silybum*. (Couplan, 2012)

Embranchement :	<i>Phanérogames</i>
Sous - embranchement :	<i>Angiospermes</i>
Classe :	<i>Magnoliopsida</i>
Ordre :	<i>Astrales</i>
Famille :	<i>Asteraceae</i>
Sous-famille :	<i>Tubuliflores</i>
Genre :	<i>Silybum</i>
Espèces :	<i>Silybum marianum</i> (L). <i>Gaerthn</i>

3. Morphologie de la plante

- **Tige :** Le Chardon-Marie est une plante vigoureuse avec une tige forte et solide qui peut atteindre une hauteur de 30 cm à 1,5 m. (**Figure. 1**) (**Ben Rahal, 2012**).



Figure 1 : Morphologie de tige de plante chardon marie (**Ben Rahal., 2012**)

- **Racine :** La plante présente une racine pivotante qui est robuste, de grande longueur, épaisse et fibreuse, (**Figure .2**), (**Sindel, 1991**).



Figure 2 : Morphologie de racine de plant chardon marie (**Alaoui, 2016**)

- **Feuille :** Le chardon Marie est caractérisé par ses grandes feuilles vertes pâles brillantes, tachées de blanc lobées et ondulées, et bordées de dents épineuses à pointe jaune très acérée. Les feuilles de la base sont pétiolées, découpées en lobes à bords dentés épineux, en rosettes. Les feuilles supérieures sont plus petites et plus étroites

réduites et embarrassantes, à bord moins découpé, mais très épineux, avec des marbrures laiteuses caractéristiques (**figure. 3**) (**Guemari, 2022**).



Figure 3: Morphologie de feuille de plant chardon marie (**Guemari, 2022**).

- **Fleur** : Les fleurs sont toutes tubuleuses réunies en capitules terminaux, solitaires, dépassant souvent 6 cm de diamètre, la plupart sont pourvues d'une épine atteignant jusqu'à 5 cm. La corolle est dentée, de couleur pourpre, 5 étamines forment un tube autour du style. Elles fleurissent depuis le mois de juin jusqu'au mois d'août. (**Figure .4**) (**Adetuyi et al., 2021**).



Figure 4: Morphologie de Fleur (**Adetuyi et al., 2021**)

- **Fruit** : Les fruits sont obovodes acènes luisantes, marron ou jaune de couleur, avec une longue aigrette blanche qui est denticulée en anneau à sa base (**Figure.5**) (**Carillon ,2017**)



Figure 5: Morphologie des fruits de plant chardon marie (**Guemari, 2022**).

La plante se distingue par sa saveur d'artichaut plutôt que par son arôme distinctif. (**Carillon ,2017**)

4. Caractéristiques botaniques

Le *Silybum marianum* est une plante adaptée aux climats secs, préférant les milieux riches en azote et poussant sous forme de graines pendant la saison froide. Il s'agit d'une espèce diploïde avec 34 chromosomes (**Qavami 2013**).

Le chardon Marie est une plante annuelle qui germe généralement en automne et commence à pousser au début de la saison de croissance. Si la saison de printemps ou d'hiver est retardée, elle peut devenir bisannuelle. Les températures froides de l'hiver favorisent la formation des fleurs, qui donnent en moyenne 55 capitules et environ 190 graines, soit environ 6350 graines par plante (**Burnie, 1997**)

Les graines peuvent entrer en dormance, mais leur durée de dormance est influencée par la température et l'humidité. Elles restent viables pendant au moins neuf ans (**Sindel, 1991**).

La floraison a lieu de juin à août et est caractérisée par une inflorescence en racème de capitule. Les graines sont complètement sèches à la fin de l'été. La pollinisation peut être autogame ou entomogame, impliquant divers moyens tels que les insectes et le vent. Le *Silybum marianum* est une plante hermaphrodite, possédant à la fois des organes reproducteurs mâles et femelles. La forte densité du chardon Marie peut être expliquée par

sa croissance vigoureuse et son potentiel allélopathique pendant la germination (Gabay et al., 1994).

5. Composition chimique du Chardon Marie

La plante *Silybum marianum* (L.) est connue pour être riche en composés actifs, notamment en silymarine, qui peut être extrait à partir de différentes parties de la plante.

➤ **Les flavanolignanes :** Les flavanolignanes (**Figure 6**), également appelés flavonolignanes ou flavolignanes, sont les composés responsables de l'activité. Plus précisément, il serait plus approprié de les désigner comme des dihydroflavonolignanes. Ils ont été initialement isolés sous la forme d'un mélange de produits résultant de l'addition de l'alcool coniférylique à un 2,3-dihydro-flavonol appelé taxifoline. Ce mélange, connu sous le nom de silymarine, représente généralement de 1,5 % à 3 % de la masse du fruit. La Silibinine (ou Silybine) est le principal constituant de ce mélange, représentant entre 60 % et 80 % de sa composition. Il s'agit d'un benzodioxane composé de deux diastéréoisomères accompagnés de leurs régioisomères (isosilybines A et B). Les autres constituants de la silymarine comprennent la Silydianine, un oxatricyclodécène résultant de la cycloaddition de l'alcool coniférylique à une o-quinone dérivée de la taxifoline, ainsi que la silychristine, qui possède une structure dihydrobenzofuranique (**Bruneton, 2016**)

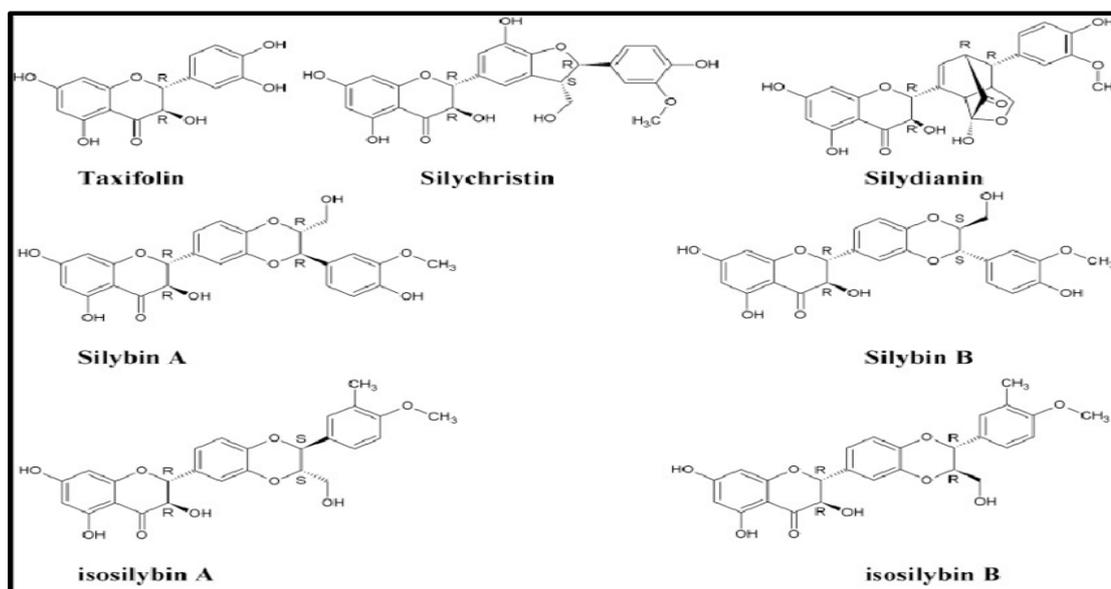


Figure 6: Structure chimique des composés de flavanolignane (Anthony et al., 2013)

- **Flavonoïdes** : Quercétol, taxifoline, ériodyctiol, chrysoériol, naringine, kaempférol-dihydrokaempférol, apigénol, naringétol (**Charrié et al., 2017**).
- **Dérivés phénoliques** : 5,7-dihydroxychromones, alcool dihydrodiconiférylique. (**Charrié et al., 2017**).
 - Les graines sont également riches en lipides (environ 30-20 %) et en protéines (environ 25-30 %), ainsi qu'en minéraux qui varient en fonction de l'organe étudié. La teneur élevée en calcium présente dans les différentes parties de la plante *Silybum marianum* (L.) lui confère une grande valeur nutritive. Les graines de cette plante sont particulièrement riches en phosphore (0,6 g.kg-1MS), tandis que les feuilles et les tiges ont des teneurs plus faibles en phosphore (respectivement 0,2 et 0,15 g.kg-1MS). Les feuilles contiennent des quantités importantes de sodium, de magnésium et de calcium, tandis que la tige est riche en potassium. (**Abenavoli et al., 2010 ; Guemari, 2022**).

6. Caractéristiques biologiques

Différents composants du chardon-Marie (silymarine, silybine, etc.) (**Tableau 01**) ont de multiples mécanismes d'action hépatoprotecteur, dont l'activité anti-inflammatoire, l'activité antioxydante, le blocage des toxines, la synthèse protéique et l'activité anti-fibrotique. La recherche a confirmé les effets protecteurs de la silymarine extraite des fruits du chardon-Marie sur les cellules saines du foie. Elle est capable de prévenir la détérioration des cellules, de faciliter le processus de nettoyage et de détoxification, ainsi que de contribuer à la régénération des cellules endommagées. (**Qavami et al., 2013**)

Tableau 1 : Activités biologiques des composés actifs (**Svobodova et al., 2006**).

Composés actifs du Chardon Marie	Activités Biologiques
Flavonoïdes	Diurétique, anti-azotémique, antispasmodgastrique, anti-inflammatoire Inhibe l'agrégation plaquettaire in vitro.
Flavonols Catéchols	-Propriétés antioxydantes. -Réduit les risques coronarien

Silymarine	-Traitement des maladies hépatiques. -Neutralise l'hépatotoxicité de la phalloïdine et l'amanitine . -Réduit l'accumulation de collagène dans le foie chez les rats. -Effet positif sur le diabète induit par l'alloxane chez les rats. -Protection du pancréas exocrine de la toxicité.
Flavonolignanes : Silandrine3deoxysilychristine, Silibinine Silymonine, Silydianine Quercétol	-Provoque la peroxydation membranaire. -Responsable de l'activité antioxydante.

- **Propriétés antioxydantes**

La silybine, joue un rôle protecteur en préservant les tissus contre les dommages induits par l'excès de fer. Une accumulation excessive de fer peut être dangereuse, car le fer catalyse la formation de divers radicaux libres, entraînant ainsi une peroxydation des lipides membranaires. Le foie est particulièrement vulnérable aux effets destructeurs du fer. Les propriétés antioxydantes de la silybine contribuent à atténuer la toxicité du fer en protégeant les tissus. De plus, des données scientifiques suggèrent que la silybine agit comme un chélateur du fer en se liant au fer libre, facilitant ainsi son élimination par la bile. (Qavami et al., 2013).

- **Activité anti-inflammatoire**

Les propriétés anti-inflammatoires de la silymarine sont attribuées à son pouvoir d'inhibition du facteur de transcription nucléaire κ B (NF- κ B). Ce facteur régule et coordonne l'expression de nombreux gènes impliqués dans des processus tels que l'inflammation, la survie cellulaire, la différenciation et la croissance. Ainsi, la silymarine agit en bloquant l'activité du NF- κ B, ce qui contribue à ses effets anti-inflammatoires. (Qavami. et al., 2013).

- **Activité anticancéreuse**

La carcinogenèse est un processus complexe comprenant plusieurs étapes, qui est activé par des altérations dans l'expression de facteurs de transcription et de protéines impliquées dans la prolifération cellulaire, la régulation du cycle cellulaire, la différenciation, l'apoptose, l'angiogenèse, l'invasion et la métastase. La silymarine et la silybine interviennent dans le rééquilibrage entre la survie cellulaire et l'apoptose en

modulant l'expression de régulateurs du cycle cellulaire et de protéines impliquées dans l'apoptose. L'efficacité anticancéreuse de la silymarine a été démontrée dans divers types de cancer, tels que le cancer du sein, le cancer de la peau, le cancer de la prostate, le cancer du col de l'utérus, le cancer du côlon, le cancer des ovaires, le carcinome hépatocellulaire, le cancer de la vessie et les cellules cancéreuses pulmonaires. (**Qavami et al., 2013**).

- **Activité hépatoprotectrice**

La silymarine est utilisée depuis des siècles en tant qu'agent hépatoprotecteur. Ses effets bénéfiques sont attribués à sa capacité antioxydante directe et/ou indirecte. La silymarine agit comme un capteur d'espèces réactives de l'oxygène, un piège à radicaux cétyle phénylglyoxylique, et un antioxydant capable de rompre les réactions en chaîne oxydatives (**Qavami et al., 2013**).

- **Activité antidiabétique**

L'effet de la silymarine sur la diminution de la glycémie à jeun et des niveaux d'insuline en fait un composé antihyperglycémique prometteur. Des études ont également démontré les puissantes propriétés hypoglycémiques et antihyperglycémiques d'un extrait aqueux de chardon-Marie dans des modèles animaux expérimentaux de diabète (**Qavami et al., 2013**).

- **Propriété virales**

Des études *in vitro* ont révélé les propriétés antivirales de la silymarine et de certains composés isolés tels que la silybine, l'isosilybine A et la taxifoline contre différents virus tels que le virus de la grippe A, le virus de l'hépatite C (VHC) et le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Dans le cas du VHC, la silymarine et la silybine ont démontré leur capacité à inhiber la réplication du virus *in vitro* sur des cultures d'hépatocytes en modulant les niveaux d'expression du TNF α et du NF- κ B. Concernant le VIH, l'application de la silymarine pendant la phase d'adsorption du virus a montré une inhibition de l'infection des lymphocytes T 101, tandis que la silibinine a atténué les fonctions cellulaires impliquées dans l'activation, la prolifération des lymphocytes T et la réplication du VIH-1. En outre, la silymarine interfère avec le mécanisme d'endocytose, retardant ainsi la pénétration du virus dans la cellule et empêchant sa prise en charge par la transferrine. (**Charrié et al., 2017**).

Partie expérimentale

II. Cadre d'étude

Dans ce contexte que notre travail a été effectuée dont les objectifs sont les suivants : Etude des rendements des extraits de feuilles et de fleurs de la plante de chardon marie (*Silybum marianum*), le dosage des phénols totaux de plante étudiée, et enfin, la mise en évidence de l'activité antimicrobiennes des extraits sur des microorganismes pathogènes.

III. Matériels et méthodes

1. Matériel végétal

1.1. Récolte de la plante

La collecte des feuilles et fleurs de la plante a été réalisé dès les mois de septembre et janvier 2022-2023 de la région ELMRIDJE, BEDJEN, dans wilaya de Tébessa (Figure7).



Figure 7: Photos originales de chardon marie feuilles et fleurs. (Photos personnelles)

1.2. Séchage et broyage

Les échantillons sont séchés à l'abri de la lumière et l'humidité la chaleur puis sont conservées à l'ombre dans un endroit sec. Ensuite ils sont broyés à l'aide d'un broyeur électronique jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. (Figure 08 ,09)



Figure 8: Photos originales des feuilles et fleurs de chardon marie sèches. (Photos personnelles)



Figure 9: Photos originales des feuilles et fleurs de Chardon Marie broyés. (Photos personnelles)

2. Matériel biologique

Nous avons utilisé 9 souches microbiennes : 2 levures 3 bactéries à gram positif et 4 bactéries à gram négatif (Tableau 2)

Les souches ont été isolées à partir des prélèvements cliniques et identifiées au niveau de laboratoire de microbiologie.

Tableau 2 : Les souches utilisées.

Champignon		<i>Candida ssp 1</i> <i>Candida ssp 2</i>
Bactérie	Gram +	<i>SCN 1</i> <i>SCP</i> <i>SCN 2</i>
	Gram -	<i>Klebsiela pneumoniae</i> <i>E. coli</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Enterobacter</i>

3. Préparation des extraits

3.1. Extrait aqueux

Pour l'extraction aqueuse, (**Figure 10**) le premier essai on prend 10 grammes pour les feuilles et on ajoute 200 ml d'eau distillé, et on prend 2,5 g de la poudre des feuilles et 50 ml d'eau distillé pour le deuxième et le troisième essai. Pour les fleurs, on prend 2,5 g et on ajoute 50 ml d'eau distillé et on fait trois essais. On chauffe les mélanges dans un bain marie à 77°C pendant 30 minutes, après le refroidissement des mélanges on faire la filtration sur un papier filtre Wathman n°1, après la récupération des résidus des MV on répète la procédure trois fois (**Nshimiyimana et al., 2010**).



Figure 10 : Photos originales de protocole d'extraction aqueux. (Photos personnelles)

3.2. Extraction hydro-méthanolique

Pour l'extraction méthanolique, on prend 2,5 g de MV et 50 ml de solution méthanol aqueux (80 :20) pour les trois essais des feuilles et les autres trois essais des fleurs, on chauffe la solution jusqu'à l'ébullition après on ajoute la matière végétale avec agitation de temps

en temps jusqu'à parfaite refroidissement. On laisse les six échantillons dans la solution 24h, et on passe à l'étape de filtration par papier filtre Wathman n°1 après on répéter la macération deux fois. On obtient six filtrats (Hamia et al., 2014).

3.3. Evaporation des solvants

On utilise le rotavap pour récupérer l'extrait liquide de chaque échantillon (Figure 11) ($T^{\circ} = 45^{\circ}\text{C}$ et vitesse de rotation = 3 pour les extraits méthanoïques $T^{\circ} = 65^{\circ}\text{C}$ et vitesse de rotation = 4 pour les extrais aqueux), et on les met dans une étuve de 44°C pour récupérer l'extrait solide.



Figure 11 : Photo original de rotavap lors de vaporisation des solvants. (Photo personnelle)

4. Calcule de rendements des extractions

Les rendements des extractions sont calculés suivant la formule ci-dessous: (Boubekri, 2014) :

$$Rdt \% = (ME/MV) * 100$$

Rdt : rendement en pourcentage

ME : masse de l'extrait en gramme.

MV : masse de matière végétale en gramme.

5. Activité antimicrobienne des extraits

5.1. Méthode de diffusion sur disques (aromatogramme)

L'aromatogramme ou méthode de diffusion en milieu gélosé ou encore méthode de disques est une technique qualitative permettant de déterminer la sensibilité des microorganismes vis à vis d'une boîte de pétri dans un milieu nutritif solide (**Figure 12**) (**Ouaar, 2018**).

5.2. Préparation des inoculum

Pour préparer l'inoculum, nous avons utilisé une pipette Pasteur pour prélever quelques colonies bien isolées des souches cibles à partir d'une culture fraîche de 18 à 24 heures sur milieu gélosé nutritif. Nous avons ensuite déchargé les colonies dans de l'eau physiologique et homogénéisé le tout à l'aide d'un Vortex. Cet inoculum a ensuite été utilisé pour ensemer des boîtes de Pétri stériles en les écouvillonnant. Les boîtes étaient préalablement remplies de gélose MH sur une épaisseur de 4 mm et séchées pendant 30 minutes à température ambiante avant leur utilisation.

5.3. Application des disques des extraits

Des disques en papier Wattman N°1 d'un diamètre de 6 mm ont été préparés et stérilisés. Chacun de ces disques a ensuite été chargé avec 10 µl de chaque extrait (extrait 50% pour le premier essai, lorsque on prend des zones d'inhibition > 7mm on essaie la 2^{ème} dilution pour les souches sensible), puis déposé à la surface de boîtes contenant des microorganismes ensemenés (huit disques par boîte). Les boîtes ont été laissées à diffuser à température ambiante, puis incubées à une température de 37°C pendant 18 à 24 heures. Deux essais ont été réalisés pour chaque extrait. Les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés en mm. En conclusion, cette méthode permet de mesurer l'efficacité des extraits contre les micro-organismes étudiés.

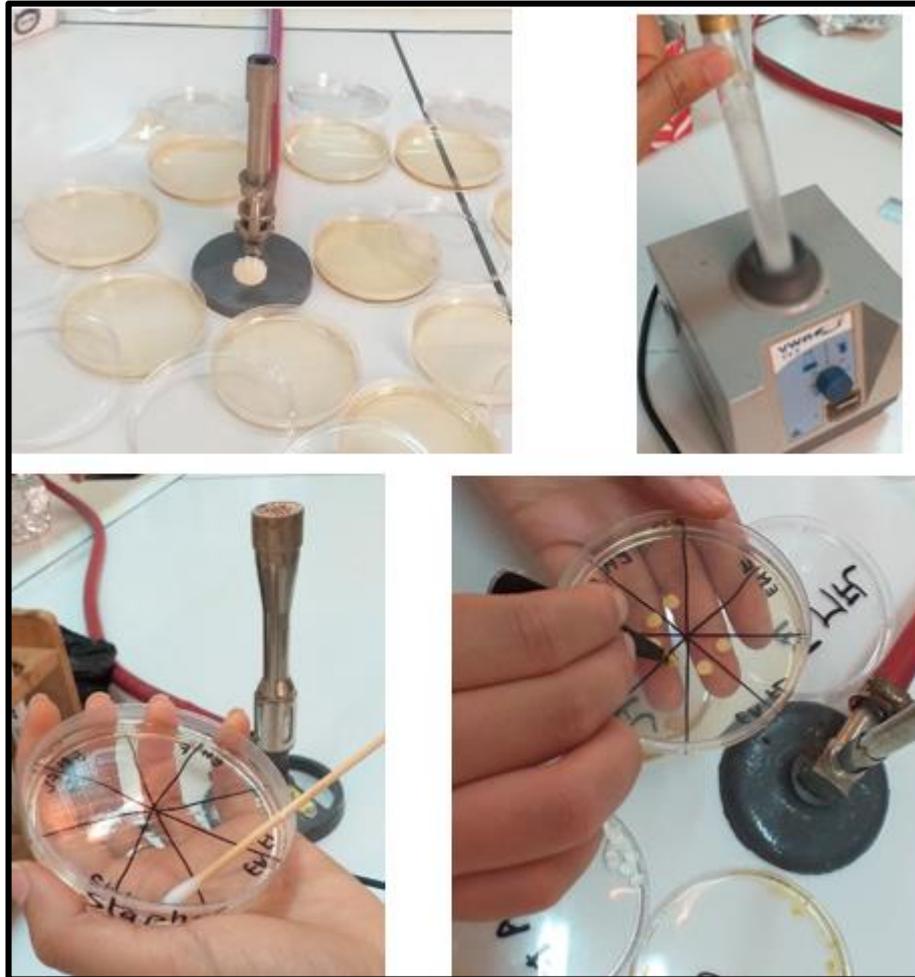


Figure 12: Photos originales des étapes de l'aromatogramme. (Photos personnelles)

- **Interprétation des résultats**

Les diamètres sont mesurés en mm étant la moyenne des trois essais « Interprétation Au terme du temps d'incubation, les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés en mm à l'aide d'une règle ». (Sfeir et al., 2013)

- Non sensible (-) ou résistante <8mm
- Sensible (+) =8-12mm
- Très sensible (++) = 12-19mm
- Extrêmement sensible (++>) >20mm

6. Dosage des polyphénols totaux

Les polyphénols totaux ont été quantifiés en utilisant la spectrophotométrie (Figure 13) avec la méthode colorimétrique du réactif de Folin-Ciocalteu .Cette méthode permet de

mesurer la concentration totale de groupements hydroxyles présents dans l'extrait. Le protocole utilisé est une adaptation du procédé décrit par **Singleton et Ross en 1965**.

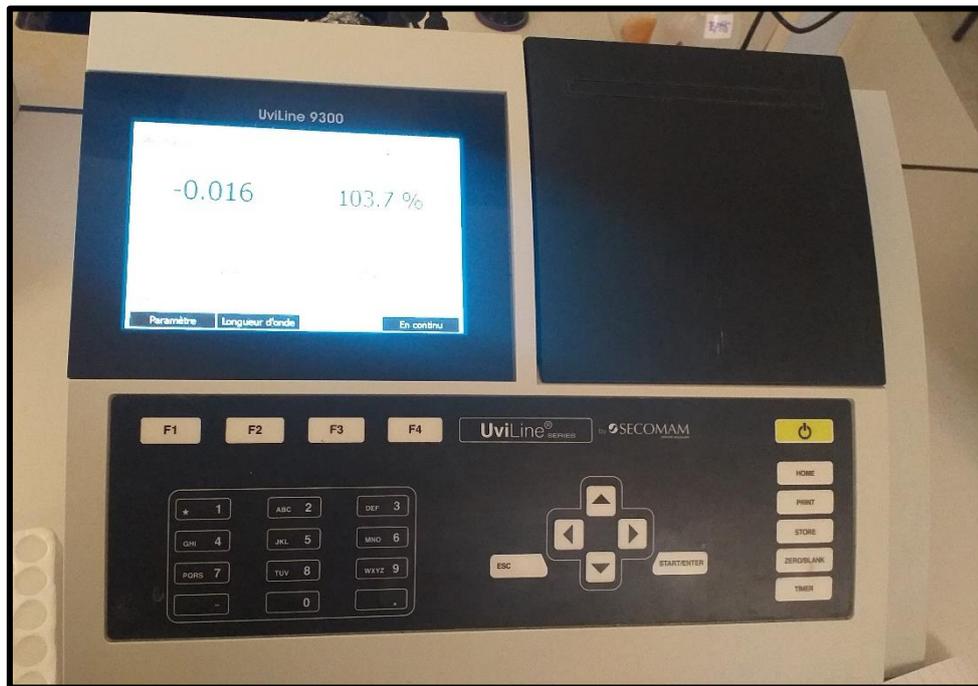


Figure 13: Photo originale de spectrophotomètre lors de la lecture d'absorbance en 765nm. (Photo personnelle)

7. Analyse statistiques

La saisie et l'analyse statistique des données ont été réalisées à l'aide du logiciel Stat Plus version 7.8.11 2022 pour MAC. Ce logiciel permet la détermination des fréquences des variables qualitatives, la détermination des moyennes et des écarts types pour les variables quantitatives ; la comparaison des moyennes. Le test Statistique utilisé est l'ANOVA. Les différences ont été considérées comme significatives lorsque $P < 0.05$.



CONCLUSION

Après la fin de l'étude de l'effet de l'extrait de plante de chardon-Marie (feuilles et fleurs) par la méthode aqueuse et méthanolique contre micro-organismes, ainsi que la détermination du taux de composés phénoliques totaux dans les extraits aqueux et méthanolique de chardon Marie, nous concluons que le rendement de l'extrait méthanolique de Chardon marie des feuilles a obtenu la quantité la plus élevée, tandis que le rendement le plus faible était celui de l'extrait méthanolique des fleurs.

Le chardon-Marie est constitué de composés phénoliques où l'extrait le plus riche a été l'extrait de fleur méthanolique, tandis que le plus faible a été l'extrait aqueux de feuille.

Pour l'étude de l'activité antimicrobienne, l'extrait de chardon-marie a eu un fort effet sur chacun d'Enterobacter, *SCN 02*, *Candida 02*, tandis qu'ils n'ont eu aucun effet s sur *E.coli*, *SCP Candida 01*.

Notons enfin que ce travail va nous ouvrir des horizons de recherche ciblés dans le domaine des plantes utilisées en médecine traditionnelle, notamment en termes de mise en évidence des principes actifs et l'évaluation de leurs activités biologiques, ce qui nous pousse de recommander de faire des études approfondies pour montrer leurs effets *in vivo*.

Références bibliographiques

A

Abenavoli, L., Capasso, R., Milic, N., & Capasso, F. (2010). Milk thistle in liver diseases: past, present, future. *Phytotherapy Research*, 24(10), 1423-1432.

Adetuyi Babatunde. O., Foluke K. Omolabi, Peace A. Olajide, Julius K. Oloke (2021) Pharmacological., Biochemical and Therapeutic Potential of Milk Thistle (Silymarin): A Review WNOFNS 37 75-91.

Akhtar N., Ihsan UH., Bushra M. (2015) Phytochemical analysis and comprehensive evaluation of antimicrobial and antioxidant properties of 61 medicinal plant species, *Arabian Journal of Chemistry*; 1-13.

Alaoui, IS. (2016). Valorisation de deux plantes marocaines *Melia azedarach* et *Silybum marianum*. Thèse de doctorat. Université Mohamed V Maroc 190p.

Anthony. K., Subramanya. G., Uprichard. S., Hammouda. F., & Saleh. M. (2013), Antioxidant and Anti-Hepatitis C Viral Activities of Commercial Milk Thistle Food Supplements, *Antioxidants*, 2, 23-36.

Arrigo Y., Scharenberg A. (2006). Les plantes riches en tanins dans l'affouragement des ruminants. Journée d'information ALP

B

Benchaachoua, A. (2019) Caractérisation et Valorisation d'une plante de la famille des astéracées de la région de Sidi Bel Abbès : Évaluation des substances bioactives de *Silybum marianum*. Thèse de doctorat en UNIVERSITÉ DJILLALILI ABÈS Sidi Bel Abbès, Algérie, 201p.

Benchaachoua, A., Mahdjoub Bessam, H., Saidi, I.(2018) Effects of Different Extraction Methods and Solvents on the Phenolic Composition and Antioxidant Activity of *Silybum Marianum* Leaves Extracts. *International Journal of Medical Science and Clinical Invention* 5(03): 3641-3647.

Bencheikh, S.E., Ladjel, S., (2017) Etude de l'activité des huiles essentielles de la plante *Teucrium polium ssp Aurasianum Libatae* (Doctoral dissertation. Thèse de doctorat en Université Kasdi Merbah, 90p.

Ben Rahal, N. (2012), Extraction, identification et caractérisation des molécules bioactives de la graine et de l'huile de *Silybum marianum*. Étude de leurs activités antioxydante et antitumorale. Thèse de doctorat. Université de Lorraine. France 197p

Boubekri, C. (2014). Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques. Thèse de doctorat en UNIVERSITE MOHAMED KHIDER BISKRA, Algérie, 210p

Bruneton.J. (2016). Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, 5^{ème}ED, ED, Lavoisier Tec & Doc, Paris : 401-402.

Burnie. G. (1997). Encyclopédie de botanique et de l'horticulture, Plus de 10.000 plantes du monde entier, ED, Random house Australiaptyltd : 843p

C

Carillon, A. (2017). PLANTES MÉDICINALES Phytothérapie clinique intégrative et médecine endobiogénique Éditeur : Tec & Doc Lavoisier; Illustrated édition 688 p.

Charrié. JC ; Chastel. B ; Cieur. C ; Combe .P; Damak .M; Hedayat.K; Saigne-soulard .C. (2017).Plantes médicinales, Phytothérapie clinique intégrative et médecine endobiogénique, ED, Lavoisier Tec & Doc : 256-257-260-261-262,264.

Couplan, F. (2012) Les plantes et leurs noms : Histoires insolites, Quae, 44p.

Cowan, MM. (1999) Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*; 12 (4): 564- 582.

G

Gabay. R; Plitmann.U; Danin.A. (1994). Facteurs affectant la dormance du *marianum* L (Asteraceae) de *Silybum* dans ses habitats spécifiques, *Flore* 189: 201, 206

Gamil, EI., Mohamed, AE., Omayma, AE., Ahmed, MAS. (2013). Effect of extraction on phenolic content, silymarin and antiradical activities of artichoke leaves and roots, *European Scientific Journal*; 9(6):100-110

Ghasemian, A .,Eslami, M .,Hasanvand,F., Bozorgi,H., Al-Abodi H R .,(2019)- *Eucalyptus camaldulensis* properties for use in the eradication of infections 65:234-237.

Guemari, F (2022). Screening phytochimiques et identification de polyphénols, évaluation de l'activité antioxydant et étude de propriétés biologiques d'extrait de *Silybum marianum*

(L.), Thèse de doctorat, UNIVERSITÉ ECHAHID HAMMA LAKHDAR EL-OUED, Algérie ,142p

H

Hamia C., Guergab A., Rennane N., Birache M., Haddad M., Saidi M et Yousfi M. (2014) Influence des solvants sur le contenu en composés phénoliques et l'activité antioxydante des extraits du rhanterium adpressium. Annales des sciences et technologie. Vol 6. N° 1.

N

Nshimiyimana. D S., and He Q. (2010) Radical Scavenging Capacity of Rwandan CTC Tea Polyphenols Extracted Using Microwave Assisted Extraction. Pakistan Journal of Nutrition. 9 (6): 589-593.

Nunes, C., Arantes, M., Pereira, S., Cruz, L., Passos, M., Moraes, L., Vieira I and Oliveira, D. (2020) Plants as Sources of Anti-Inflammatory Agents, *Molecules*, 25, 3726.

O

OMS. (2020) Résistance aux antibiotiques. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>.

Ouaar D, Megherbi-Benali A, Lotte S, Gérard J et Toumi-Benali F, (2018). Activité antibactérienne de l'huile essentielle extraite de la sciure de bois de *Juniperus oxycedrus* subsp. *Oxycedrus*. CNRS. P 275.

Q

Qavami. N; NaghdiBadi. H; Labbafi. MR; Mehrafarin. A. (2013).A Review on Pharmacological, Cultivation and Biotechnology Aspects of Milk Thistle (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.), 12: 20, 25, 28-29-30-31.

S

Salem N., Wissal D., Anas G., Fatma M., Gharbi S., Khammassi S., Marzouk B., Férid L., Ben Chaouacha RC. (2016) Antioxydant activity of *Silybum marianum* and *Ajuga iva* natural dyes. International Journal of Control, Energy and Electrical Engineering (CEEE); 3(2)1-6.

- Seoungwoo, S., Jung-A, L., Minkyung, K.,Hyunwoo, K.,Eunsun, J.** (2015), Anti-Glycation Activities of Phenolic Constituents from Silybum marianum (Milk Thistle) Flower in Vitro and on Human Explants. *Molecules*, 20(3), 3549-3564.
- Sfeir, J., Le François, C., Baudoux, D., Derbré, S. et Licznar, P.** (2013).In vitro antibacterial activity of essential oils against Streptococcus pyogenes. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2013, ID 269161
- Sindel. B.M.**, (1991). A review of the ecology and control of thistles in Australia. *Weed Research* 1991; (31): 189-201.
- Singleton. V.L., Orthofer. R, Lamuela-Raventos.R.M.** (1999), "Analysis of total phenols and other oxidant substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent" *Methods Enzymol*, Vol. (299), p152.
- Singleton V.L., Rossi J.R.** (1965), "Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphothungstic acid" *Am. J. Enol. Vitic*, Vol. (16), p144.
- Sun J., Li X., Yu X.**, (2016), Antioxidant Activities, Total Flavonoids and Phenolics Content in Different Parts of Silybum Marianum L. *Plants, Chemical Engineering Transactions*, 55, 37-42.
- Svobodova A., Walterova D., Psotova J.** (2006). Influence of silymarin and its flavonolignans on H₂O₂-induced oxidative stress in human keratinocytes and mouse fibroblasts. *Burns*, (32):973–979.
- Syed Muhammad M. S., Khan A. K., Syed Muhammad H. S., Kamran A. C., Syed Muhammad S. S. P., Muhammad Asif K., Arshad F.** (2013). Evaluation of Phytochemicals and Antimicrobial Activity of White and Blue Capitulum and Whole Plant of Silybum Marianum. *World Applied Sciences Journal*; 12 (8): 1139-1144.

Annexe

Annexe n°1: matériels non-biologique

- Grands matériels :

Agitateur (vortex).

Autoclave.

Bain marie.

Balance.

Etuve

Plaque chauffante.

Réfrigérateur.

Rotavap (BUCHI)

- Petits matériels :

Anse de platine.

Barreaux magnétique

Bec bunsen.

Boîtes de Pétri

Portoirs.

Micropipette

Papier wattman n°1

Pipettes Pasteur.

Spatule.

- Les verreries :

Béchers gradués

Eprouvettes graduées

Tubes à essai stériles.

Les flacons

Les fioles erlenmeyers

Annexe n°2: Produits chimiques

Chlorure de sodium Na Cl

Bicarbonate de sodium NaHCO₃

Méthanol CH₄OH

Ethanol C₂H₆O

Acide gallique C₇H₆O₅

Réactif Folin-Ciocalteu

Annexe n°3: Préparation des milieux de culture

➤ Milieu de gélose nutritive **GN** :

- Dissoudre 20g de milieu déshydraté dans l'eau distillée en agitant continuellement, puis ajuster à 1L ;
- Chauffer le milieu jusqu' à dissolution totale sur une plaque chauffante toujours en remuant avec un agitateur magnétique ;
- Autoclaver à 121° C pendant 15 min.

➤ Milieu de Mueller Hinton **MH** :

- Dissoudre 36g de milieu déshydraté dans l'eau distillée en agitant continuellement, puis ajuster à 1L ;
- Chauffer le milieu jusqu' à dissolution totale sur une plaque chauffante toujours en remuant avec un agitateur magnétique ;
- Autoclaver à 121° C pendant 15 min.