

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid
Ibn Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن
باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

Mlle. Rahou Fatima Zohra et M^{lle}. Khazini Fatma

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité: Microbiologie Fondamentale

THÈME

**Effet antimicrobien de l'extrait hydro-éthanolique
de Miswak (*Salvadora persica*)
Chez *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*.**

Devant le Jury

Président	: Mr AIT SAADA D	MCA	U. Mostaganem
Promotrice	: M ^{me} AIT CHABANE O	MCB	U. Mostaganem
Examineur	: Mr BAKKADA AMA	Prof	CU. Tissemsilt

Année universitaire : 2019/2020

REMERCIEMENTS

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le Tous Puissant et le tout miséricordieux, pour nous avoir donné la force et la volonté d'accomplir ce modeste travail.

Nous tenons à exprimer nos sincère remerciement, à Madame AITCHABANE Ouiza maître de conférences classe B à l'Université Abdelhamid Ibn Badis- Mostaganem, pour son encadrement agréable, son soutien, ces fructueux conseils, ces explications, et son encouragements afin de réaliser ce modeste mémoire.

Nous exprimons notre sincère gratitude à Monsieur AIT SAADA maître de conférences classe A à l'Université Abdelhamid Ibn Badis- Mostaganem, d'avoir accepté de présider le jury.

Nos remerciements vont également à Monsieur BAKKADA AHMED professeur au centre Universitaire de Tissemsilt, d'avoir accepté d'examiner et de faire partie du jury.

LISTE DES TABLEAUX

Tableaux 01. Climatologie globale à In Salah (2000-2015)	15
Tableau 02. Effets antimicrobiens de l'extrait hydroéthanolique de <i>Salvadora persica</i> sur la croissance de <i>candida albicans</i>	24
Tableau 03. Effets antimicrobiens de l'extrait hydroéthanolique de <i>Salvadora persica</i> sur la croissance de <i>Staphylococcus aureus</i>	26

Liste des figures

Figure 01. Aspect botanique de l'espèce <i>Salvadora persica</i>	03
Figure 02. Photographie des Rameaux de <i>Salvadora persica</i>	05
Figure 03. Photographie des Feuilles de <i>Salvadora persica</i>	05
Figure 04. Photographie des fruits de <i>S. persica</i>	05
Figure 05. <i>Candida albicans</i>	09
Figure 06. Représentation des différentes morphologies de <i>C. albicans</i>	10
Figure 07. Couques de <i>Staphylococcus aureus</i> disposées en grappes de raisins ; micrographie électronique à balayage (Gx100).....	12
Figure 08. Carte géographique de régions de récolte de l'espèce <i>salvadora persica</i> (willaya de In Salah).....	15
Figure 09. Méthode d'Activation des souches bactériens.....	17
Figure10. Méthode de contact direct.....	18
Figure 11. Méthode des disques par diffusion sur milieu de Muller Hinton.....	19
Figure 12. Concentration Minimale Inhibitrice (CMI).	21
Figure 13. Principales étapes de la détermination de la CMB	22

Résumé :

L'étude expérimentale est consacrée à l'évaluation des effets antimicrobiens de l'extrait au solvant hydroéthanolique de miswak (*Salvadora persica*) récolté dans la région d'ARAK à Ain Salah-Algérie sur les certains microorganismes pathogènes responsables d'infections buccodentaires. L'extrait de Miswak a été obtenu par macération d'une prise du végétal dans de l'éthanol aqueux, suivi d'une filtration et d'une évaporation du filtrat. L'extrait a été concentré à l'eau distillée à 0, 20, 40, 60, 80 et 100%. L'effet antimicrobien de l'extrait de Miswak a été testé sur deux microorganismes : *C. albicans* et *S. aureus*. Les mesures ont concerné : le test de croissance, le test de diffusion sur disque, la concentration minimale inhibitrice, la concentration minimale bactéricide et la concentration minimale fongicide.

Les solutions d'extrait de *S. persica* ont engendré des fortes activités antimicrobiennes chez *S. aureus* et *C. albicans*.

La concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale fongicide (CMF) ont été réalisées chez *Candida albicans* à 40% d'extrait de miswak. Par contre, chez *Staphylococcus aureus*, la CMI et la concentration minimale bactéricide (CMB) ont été enregistrées à 80 d'extrait de la plante étudiée.

Par ailleurs, l'extrait de Miswak a montré une action de type bactéricide chez *Staphylococcus aureus* et de type fongicide chez *Candida albicans*.

Mots clés : *Salvadora persica*, Miswak, *Candida albican*, *Staphylococcus aureus*, antimicrobien, extrait, éthanol, hydro, aqueux.

Abstart :

The experimental study is devoted to the evaluation of the antimicrobial effects of the hydroethanolic solvent extract of miswak (*Salvadora persica*) collected in the ARAK region in Ain Salah-Algeria on certain pathogenic microorganisms responsible for oral infections. The Miswak extract was obtained by macerating an intake of the plant in aqueous ethanol, followed by filtration and evaporation of the filtrate. The extract was concentrated in 0, 20, 40, 60, 80 and 100% distilled water. The antimicrobial effect of Miswak extract has been tested on two microorganisms: *C. albicans* and *S. aureus*. The measurements concerned: the growth test, the disk diffusion test, the minimum inhibitory concentration, the minimum bactericidal concentration and the minimum fungicidal concentration.

Solutions of *S. persica* extract produced strong antimicrobial activity in *S. aureus* and *C. albicans*.

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (CMF) were achieved in *Candida albicans* at 40% miswak extract. In contrast, in *S. aureus*, the MIC and minimum bactericidal concentration (CMB) were recorded at 80 extract of the plant studied.

Furthermore, the Miswaka extract showed a bactericidal-like action in *Staphylococcus aureus* and a fungicidal-like action in *Candida albicans*.

Key words: *Salvadora persica*, Miswak, *Candida albican*, *Staphylococcus aureus*, antimicrobial, extract, ethanol, hydro, aqueous.

ملخص :

الدراسة التجريبية مكرسة لتقييم التأثيرات المضادة للميكروبات لمستخلص المذيب المائي الإيثاني للمسواك (سلفادورا بيرسيكا) الذي تم جمعه في منطقة أراك في عين صلاح-الجزائر على بعض الكائنات الحية الدقيقة المسببة للأمراض المسؤولة عن التهابات الفم. تم الحصول على مستخلص السواك عن طريق نقع جزء من النبات في الإيثانول المائي ، متبوعاً بالتشريح وتبخير المرشح. تم تركيز المستخلص في 0 ، 20 ، 40 ، 60 ، 80 و 100٪ ماء مقطر. تم اختبار التأثير المضاد للميكروبات لمستخلص السواك على نوعين من الكائنات الحية الدقيقة: المبيضات البيضاء والمكورات العنقودية الذهبية. القياسات المعنية: اختبار النمو ، واختبار انتشار القرص ، والتركيز المثبط الأدنى ، والحد الأدنى لتركيز مبيد الجراثيم ، والحد الأدنى لتركيز مبيد الفطريات.

أثارت محاليل مستخلص سلفادورا بيرسيكا أنشطة قوية لمضادات الميكروبات في

S. aureus و *Candida albicans*

في المبيضات البيضاء بنسبة 40٪ (CMF) والحد الأدنى لتركيز مبيد الفطريات (CMI) تم تحقيق الحد الأدنى من تركيز المثبط وأقل تركيز مبيد للجراثيم (CMI) ، تم تسجيل *Staphylococcus aureus* من مستخلص السواك. في المقابل ، في

عند 80 مستخلص من النبات المدروس (CMB)

بالإضافة إلى ذلك ، أظهر مستخلص السواك تأثيراً شبيهاً بالجراثيم في المكورات العنقودية الذهبية وعملاً شبيهاً بمبيد الفطريات في المبيضات البيضاء

الكلمات المفتاحية: سلفادورا بيرسيكا ، مسواك ، المبيضات البيضاء ، المكورات العنقودية الذهبية ، مضادات الميكروبات ، مستخلص ، إيثانول ، مائي ، مائي

Table des matières

Remerciements.	
Liste des tableaux.	
Liste des figures.	
Résumé.	
Introduction	01

Partie I : Étude bibliographique

Chapitre 01 : Généralité sur les bâtonnets *Salvadora persica*

1. Historique	03
2. Origine étymologique.....	03
3. Nomenclature de <i>Salvadora persica</i>	03
4. Classification Botanique	04
5. Localisation géographiques.....	04
6. Caractéristiques botaniques de la plante	04
7. Composition chimique du miswak.....	05
8. Propriétés du miswak	07
8.1 Propriétés antibactériennes de miswak	07
8.2 Propriétés Antifongiques.....	08
9. Usages de <i>Salvadora persica</i>	08
9.1 Importance médicinale	08

Chapitre 02: Généralités sur quelques Les germes pathogènes

1. Candida albicans

1.2 Historique.....	09
1.3 Description morphologique.....	09
1.4 Classification.....	10
1.5 Habitat	11
1.6 Pouvoir pathogène.....	11

2. *Staphylocoque aureus*

2.1 Définition	11
2.2 Historique	12
2.3 Classification.....	12
2.4 Habitat et épidémiologie	13
2.5 Pouvoir pathogènes	13

Partie II : Méthodologie

1. Objectifs	14
2. Régions de prélèvement et traitements préliminaires des échantillons.....	14
3. Climat de la région	14
4. Préparation d'échantillon	15
5. Matériels.....	16
6. Méthodes utilisés	16
6.1 Méthodes d'extractions des composés bioactifs de <i>Salvadora persica</i>	16
6.2 Etude des effets antimicrobiens des extraits de <i>Salvador persica</i>	17
6.2.1 Activation des inocula microbiens	17
6.2.2 Méthode de contact direct	17
6.2.3 Méthode des disques par diffusion sur gélose	18
6.2.4 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	19
6.2.5 Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB).....	21
6.2.6 Calculs Statistiques	22

Partie III : Résultats et Discussion

1. Résultats	23
2. Discussion	27
3. Conclusion générale	

Références Bibliographique.

Annexes

INTRODUCTION

Introduction :

Les plantes ont une importance capitale pour la survie de l'homme et des différents écosystèmes. Elles renferment une part importante des composés qui interviennent dans l'ensemble des réactions enzymatiques ou biochimiques ayant lieu dans l'organisme **(Hartmann, 2007)**.

Les propriétés antimicrobiennes des plantes médicinales sont connues depuis l'antiquité. Toutefois, il aura fallu attendre le début du 20^{ème} siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser. Un grand nombre de plantes, aromatiques, des plantes épicées et autres, possèdent des propriétés biologiques très importantes, qui trouvent des applications dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et l'agriculture **(Bahorun et al, 1994)**.

L'utilisation d'extraits de plantes et des composés d'origine végétale sont des sources précieuses pour la médecine traditionnelle dans le traitement et la prévention d'un large éventail de maladies ; notamment des maladies infectieuses **(Al- Bayati, 2007)**.

Dans ce but, l'investigation des plantes représente un potentiel inestimable pour la découverte de nouvelles substances à pouvoir antimicrobien. **(Bruneton, 1999 ; Teuscher et al., 2005)**.

L'Algérie possède une flore très diversifiée et une richesse non négligeable en plantes aromatiques et médicinales (environ 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques). Parmi eux *Salvador percica* qui pousse dans certaines régions sahariennes du pays comme Tamanrasset et Ain Salah..

L'objectif de mémoire vise en particulier à suivre l'effet antibactérien de l'extrait éthanolique du Miswak (*Salvador percica*) sur certains germes pathogènes. Plusieurs méthodes microbiologiques et approches techniques ont été utilisées lors de cette étude :

- 1- Procéder à l'extraction à l'éthanol, de la plante *Salvador percica* ;
- 2- Suivre les effets antibactériens de l'extrait de *Salvadora percica* par la méthode de contact direct sur milieu solide ;
- 3- Evaluation de l'activité inhibitrice des extraits de la plante effectuée en comparaison à un Antibiotique ;
- 4- Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) ;
- 5- Et Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB).

Le manuscrit est scindé en trois parties :

INTRODUCTION

Une première partie bibliographique ou nous allons aborder succinctement les différentes connaissances sur le SIWAK (*Salvadora persica*) et certains germes pathogènes dont *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*.

Une deuxième partie, retraçant le protocole expérimental et les méthodes utilisées dans cette étude.

La dernière partie a été consacrée à la discussion des résultats obtenus et les différentes perspectives de recherche développement à entreprendre dans le future.

Partie I :

Etude Bibliographique

Chapitre 01 :
Généralités sur les bâtonnets de
Salvadora persica

1. Historique :

Salvadora persica (Miswak ou Arak) existe depuis les temps anciens. Elle est utilisée par les Babyloniens, il y a quelques 7000 ans, par la suite son usage s'est répandu chez les Grecs, les romains, les Egyptiens et les musulmans. Aujourd'hui, se retrouve encore le miswak en Afrique, en Amérique du sud, en Asie, au Moyen-Orient, notamment en Arabie Saoudite et partout dans les pays musulmans (**Figure 01**) (**Khalid et al., 2002**).



Figure 01. Aspect botanique de l'espèce *Salvadora persica* (**Alshammary, 2008**)

2. Origine étymologique :

Le terme *Salvadora* a été trouvé pour la première fois en 1749 par le Docteur Laurent Garcin (1683- 1752), botaniste, voyageur et collectionneur de plantes. Il souhaitait faire référence à Juan *Salvadora Bosca* (1598-1681), un célèbre apothicaire espagnol originaire de Barcelone. *Persica* fait référence à l'Empire Perse, région d'origine de cette espèce végétale.

Cette plante, désertique appartenant à la famille de *Salvadoraceae*, se présente sous forme d'un arbre ou arbuste de petite taille à feuilles persistantes avec des branches blanches et des racines aromatiques (**Sofrata et al., 2008 ; Noumi et al., 2010; Hilal et Rajagopal, 2014**). Les rameaux flexibles partent directement des racines et les vieux bois produisent des feuilles très coriaces

3. Nomenclature de *Salvadora persica* :

Le nom scientifique est *Salvadora persica* L. Elle est connue sous plusieurs noms vernaculaires :

Nom arabe: arak, siwak;

Nom Anglais: toothbrush tree ;

Nom français: arbre à dents ;

Nom indien: jhak.

4. Classification botanique

Embranchement : *Spermatophyta*

Sous embranchement: *Angiospermae*

Classe : *Monocotyledoneae*

Famille : *Salvadoraceae*

Genre : *Salvadora*

Espèce: *Salvadora persica* (**Ozenda, 1983**)

5. Localisation géographiques :

Salvadora persica se trouve surtout sur les roches un peu humides et les berges des ravins (Ozenda, 1983). Elle se trouve dans tout le Sahara central: Hoggar et Tibesti, en Arabie, en Iran et en Inde, se rencontre en Mauritanie dans toute la vallée du fleuve où elle parsème le paysage de tâches de verdure pendant la période de sécheresse (**Abdellahi, 2001**).

Dans la région de Tamanghasset, *Salvadora persica* se retrouve dans les ravins des montagnes, lits sablonneux, limoneux des oueds; dans l'étage tropical ; Mouyddir: gorges d'Arak, 700m, ; Ahnet: oued Talohaq (chaude eau), Hoggar: oued silet; sud de Tamanghasset, oued tit, oued Ighighi (chaude eau); oued Terroumout, 1500-1600m, ; Tassili-n-Ajjer: oued Issadilen (Dr Rone) oued Miheroi, oued Irerer (Bary), Afara –n- ouecheran (Duveyrier); oued Tidjoudjelt(Guiard) (**Renie, 1933**) .

6. Caractéristiques botaniques de la plante :

Arbuste ou petit arbre à feuilles opposées, à inflorescences en longues grappes plus ou moins rameuses ; fleurs tétramère, à calice cupuliforme, à pétales courts vert jaunâtre, à étamines altérant avec des staminodes en forme de courtes dents ; drupe ovoïde à endocarpe, crustacé et à une seule graine (**Ozenda, 1983**).

Arbuste plus ou moins, sarmenteux ou petit arbre à fût mal conformé, à cime étalée et assez dense, de 4-5(-9) m de haut. Ecorce lisse à peu rugueuse puits plus ou moins écailleuse, blanc verdâtre devenant gris clair, à tranche jaunâtre à rose pâle. Les rameux sont glabres, portant des cicatrices entre les feuilles, gris verdâtre, striés dans la longueur (**figure02**). (**Arbonnier, 2002**)

Les feuilles sont opposées, presque charnues ; glabres, vert glauque, ovales lancéolées à elliptiques, de (3-12x1, 5-7) cm à sommet, acuminées ou obtus, parfois mucron, à base aigue ou arrondie (**figure 03**). (**Arbonnier, 2002**)



Figure 02. Rameaux de *S.persica* (Arbonnier, 2002). **Figure03.** Feuilles de *S.persica* (Arbonnier, 2002).

La nervation est pennée, irrégulière, peu saillante sur les deux faces, à (6- 8) paires de nervures secondaires devenant plus ou moins parallèles au bord du limbe. Le fruit est une baie globuleuse, glabre, portant le reste de stylet au sommet et le calice persistant à la base d'environ 6mm de diamètre, rouge à maturité (**figure04**) (Arbonnier, 2002).



Figure 04. Fruits de *S. persica*

Salvadora persica se présente en gros buissons touffus tranchant sur le reste de la végétation par sa belle couleur d'un vert tendre. Il est sarmenteux, enchevêtrant ses branches dans un fouillis inextricable. L'écorce a une tonalité blanche et ses feuilles sont toutes glabres ; les feuilles sont vert clair et deviennent plus foncées en vieillissant, ce qui en fait distinguer deux formes par les habitants (Carvalho et Gillet, 1960).

7. Composition chimique du miswak :

Les bâtonnets à mâcher issus de *Salvadora Persica* possèdent de nombreux principes actifs qu'ils libèrent pendant le brossage, lors de l'écrasement mécanique des fibres végétales.

Des propriétés chimiques sont attribuables au siwak d'après certaines Hadiths : « Le meilleur type de siwak est celui qui vient de l'arbre Arak. Le siwak du Prophète était de cet arbre. C'est une brindille naturelle, fortifiée avec des minéraux qui aident à nettoyer les dents, des inhibiteurs qui empêchent le saignement, des agents de nettoyage et un parfum qui donne une odeur naturellement fraîche au souffle. Le Siwak est une brosse idéale, naturelle, qui a été

Dotée de plus d'éléments que n'importe quelle pâte dentifrice artificielle ne pourrait jamais avoir. Les éléments chimiques présents dans le miswak sont :

Fluor : Il a des propriétés antimicrobiennes et joue un rôle dans la prévention carieuse. La quantité de fluor contenue dans les bâtonnets n'est pas assez importante pour avoir une activité anti-carieuse (**Halaway, 2011**).

Soufre : C'est un composé multivalent insoluble dans l'eau et indispensable pour les êtres vivants car il participe à la synthèse de deux acides aminés essentiels, la cystéine et la méthionine. Il est bactéricide et permet ainsi de réduire le taux de bactéries dans la cavité buccale. C'est cette substance chimique qui est responsable du goût âcre du Miswak. (**Chaurasia, A et al, 2013**).

Bicarbonate de sodium : Il est abrasif et utilisé comme dentifrice afin d'éliminer les tâches et de blanchir les dents. (**Halaway, 2011**).

Silice : Elle a un rôle abrasif et permet d'enlever les tâches, la plaque dentaire et de blanchir les dents. (**Halaway, 2011**).

Tanins : Ce sont des composés de poids moléculaire compris entre 500 et 3000 ppm, de saveur astringente et ayant la propriété de rendre la peau imputrescible. Ce sont ces antifongiques qui vont permettre de diminuer les taux de *Candida Albicans* dans la cavité buccale. Ils ont un pouvoir hémostatique, ce qui permet d'utiliser leurs molécules dans le traitement des gingivites. (**Halaway, 2011**).

Alcaloïdes comme la salvadorine : ce sont des substances hétérocycliques azotées et basiques. La salvadorine a des propriétés insecticides, antiseptiques, diurétiques, ténifuges, antitussives, bactéricides et anti-inflammatoires. (**Halaway, 2011**).

Huiles essentielles : Ce sont des substances volatiles et aromatiques de saveur âcre qui ont un rôle antiseptique, carminatif et de désinfection de la cavité buccale. Elles fournissent une odeur agréable au miswak et permettent ainsi aux utilisateurs d'avoir une bonne haleine (**Almas k et, al 2004**). Elles stimulent enfin la sécrétion salivaire.

Saponosides : Ce sont des hétérosides avec une activité d'abaissement de la tension superficielle et un pouvoir moussant et hémolytique. Elles permettent de fluidifier les sécrétions salivaires (**Faraget al., 2017**).

Résines : Ce sont des substances naturelles secrétées par certains végétaux. Elles contiennent des composés chimiquement inertes comme des phénols, des acides, des alcools ou des esters. Elles fondent à la chaleur et permettent de former une couche superficielle à la surface de l'émail afin de rendre la dent plus résistante face aux attaques carieuses (**Farag, et al ., 2017**).

Vitamine C : C'est une vitamine hydrosoluble antioxydante qui joue un rôle dans la cicatrisation et la réparation des tissus oraux. (Farag et al., 2017)

Benzylisothiocyanate (BIT) et les ions thiocyanates : ce sont des agents préventifs contre certains composés cancérigènes. Ils ont une activité bactéricide importante contre les bactéries Gram (responsables des maladies parodontales) ainsi qu'un rôle antiagrégant plaquettaire. (Farag et al., 2017)

8. Propriétés du Miswak :

8.1 Propriétés antibactériennes de Miswak :

Almas et ses collaborateurs ont réalisé une étude en 1997 où ils ont testé l'efficacité du Miswak contre différents micro-organismes (Aumeeruddy et al., 2018). Ils ont ainsi démontré que les extraits aqueux de Miswak frais et celui âgé d'un mois entraînaient une zone d'inhibition importante de la croissance de *Streptococcus Faecalis* et ce à partir d'une concentration de 5%.

Selon Almas et Zeid, le miswak a un effet antibactérien significatif sur *Streptococcus Mutans* mais moins sur *Lactobacillus*46. Ils ont observé que 50% d'extrait de *Salvadora Persica* a un effet bactéricide, 25% un effet bactériostatique et 10% de concentration sans effet sur les différents micro-organismes (Almas et al., 2004) En revanche, Al Lafi a observé que les extraits de Miswak étaient efficaces sur un grand nombre de bactéries avec un effet important sur *Staphylococcus aureus*

Les effets antibactériens varient selon les zones géographiques du miswak. Almas a ainsi observé que le *Salvadora Persica* originaire d'Arabie Saoudite est efficace contre *Streptococcus Faecalis* alors que celui originaire du Pakistan n'a aucune activité antibactérienne (Almas, 2001)

L'étude de Sofrata révèle que *Salvadora Persica* a un effet antibactérien contre plusieurs microorganismes responsables des maladies carieuses et parodontales tels que *Streptococcus Mutans*, *Lactobacillus Acidophilus*, *Aggregatibacter Actinomycet emcomitans*, *Porphyromonas Gingivalis* et *Haemophilus Influenza* (Sofrata et al., 2011).

Le Benzylisothiocyanate, composé majoritaire de la racine de *Salvadora Persica*, entraîne une inhibition de la croissance et de la production d'acides par *Streptococcus Mutans*, principale bactérie cariogène. Certains auteurs, comme Al Salman, ont voulu tester l'effet de *Salvadora Persica* comme solution d'irrigation endodontique en comparant l'effet antibactérien avec une solution de référence, l'hypochlorite de sodium (Aumeeruddy et al. 2018), Il a été démontré que la solution de *Salvadora Persica* à 10% entraîne une réduction

Significative du nombre de bactéries aérobies et anaérobies. Néanmoins, l'efficacité étant inférieure à la solution d'hypochlorite de sodium.

8.2 Propriétés Antifongiques :

L'action antifongique de *Salvadora Persica* a été étudiée in vitro à l'aide de plaques de gélose sur lesquelles ont été exposées différentes espèces de *Candida*. Ces tests ont montré une inhibition de la prolifération de ces microorganismes (**Noumietal, 2010 et Al-Bagieh et al., 1994**). La plupart de ces études analysent un champignon microscopique opportuniste naturellement présent en bouche : *Candida albicans*. Il devient pathogène lorsque les défenses immunitaires de l'hôte sont affaiblies et qu'il existe un déséquilibre de la flore buccale. Il est responsable de l'apparition de mycoses buccales, encore appelées Candidoses. (**Niazietal., 2016**).

9. Importance médicinale

Salvadora persica est utilisé dans différents traitements de maux. Les branches servent à confectionner des cures dents. Les feuilles bouillies dans du leben (lait aigri) et additionnées de poivre sont employées pour le traitement des coryzas et des rhumes (**Renie, 1933**). Elles sont utilisées pour les traitements de la toux, la bronchite, l'asthme, les flatulences et la dyspepsie. Les racines sont efficaces comme une vermifuge et utilisé contre la fièvre, les céphalées, le rhumatisme. Le décocte des rameaux et feuilles serait efficace contre la dysurie. La poudre d'écorce des racines est utilisée dans le traitement de l'ictère, le fruit pour la fertilité féminine (**Arbonnier, 2002**).

Salvadora persica est également efficace pour l'anémie post paludique, inflammation des voies respiratoire et maladies hépatiques (**Abdellahi, 2001**). La plante a encore des utilisations médicinales selon Ibn-Elkaiem dans son livre Al-TibAlnabaoi (1983) elle Élimine la mauvaise odeur, améliore le sens du goût, aiguise la mémoire, aiguise l'intelligence, élimine la glaire, empêche la carie dentaire, une cure pour les maux de tête, élimine les maux dentaire, enlève la couleur jaunâtre de la dent, facilite la digestion, éclaircie la voix et Facilite l'appétit.

Chapitre 02 :

**Généralités sur quelques
germes pathogènes**

1. *Candida albicans* :

1.1 Définition :

Le genre *Candida* fait partie du phylum des Ascomycètes de la classe des *Saccharomycètes* (forme télomorphe ou sexuée). En mycologie humaine, la forme sexuée étant rarement rencontrée, le nom de la forme asexuée (anamorphe) est alors utilisé. Ce genre comprend environ 200 espèces, mais moins d'une vingtaine d'entre elles sont fréquemment impliquées dans un processus pathologique. Ce genre, le plus fréquemment isolé en pathologie humaine, est responsable de plus de 80 % des infections à levures. Depuis 1984, le genre *Torulopsis*, qui comprenait les espèces ne formant pas de pseudofilaments a été supprimé et regroupé avec le genre *Candida* (**Figure 05**)(Koenig,1995).



Figure 05. *Candida albicans* (Carip et al.,2015)

1.2 Historique :

Les levures sont responsables de pathologies connues depuis l'Antiquité. Hippocrate avait en effet déjà décrit le muguet au IV^{ème} siècle avant J.C. mais ce n'est qu'en 1939 que Langenbeck attribua cette infection buccale caractéristique à un champignon. En 1847, ce micro-organisme fut nommé *Oidium albicans* par Robien, puis *Monilia albicans* par Zap en 1880. Enfin en 1932, *Berhoutransfera* cette espèce dans le genre *Candida*. A partir de 1950, avec l'arrivée des antibiotiques et de leurs larges utilisations (**Ripert,2013**).

1.3 Description morphologique :

Les *Candida* sont des micromycètes (champignons microscopiques). Ces organismes eucaryotes sont caractérisés par un appareil végétatif (thalle) composé de spores. La forme levure ou blastopore est une structure unicellulaire, ronde ou ovoïde de taille variable (2 à 12 μm) se multipliant par simple bourgeonnement selon un mode de reproduction asexué de type blastique solitaire. Les levures sont non pigmentées et non capsulées. A l'exception de *C. glabrata*, les levures du genre *Candida* peuvent produire des filaments.

Deux formes filamenteuses peuvent être observées :

a- Pseudofilament (ou pseudo-mycélium) résulte de la formation successive de bourgeons qui s'allongent sans se détacher de la cellule mère et des bourgeons précédents. Il n'y a pas de véritable septation mais uniquement des constriction entre chaque bourgeon.

b- Mycélium vrai est une véritable forme filamenteuse cloisonnée et ramifiée. Cette structure s'observe seulement pour quelques espèces dont *C. albicans* (Ripert, 2013).

La forme levure est souvent associée à un état commensal alors que les formes filamenteuses sont retrouvées de façon importante dans les situations d'infections. La capacité de *Candida albicans* à changer de morphologie participe à la virulence du pathogène lors de cette étape du processus de l'infection (Thompson, 2011).

La formation de chlamydospores est particulière aux espèces *C. albicans* et *C.dubliniensis*. Il s'agit de structures arrondies de grande taille (6 à 15 μm) à parois épaisses qui se forment sur les filaments. Ces structures observées sur des milieux pauvres servent au diagnostic d'espèce (Figure 06)(Thompson et al.,2011).

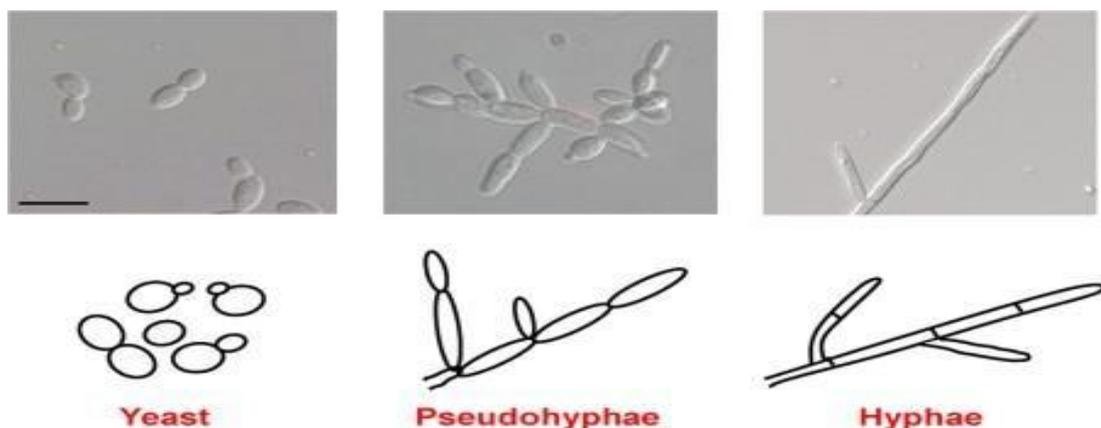


Figure06. Représentation des différentes morphologies de *C. albicans* (Thompson et al., 2011).

1.4 Classification :

Il existe plusieurs types de classification de *C. albicans* dont la plus utilisée est la Classification selon La reproduction asexuée:

Règne : *Fungi*

Division : *Deutéromycotina*

Classe : *Blastomycetes*

Ordre : *Cryptococcales*

Famille : *Cryptococcaceae*

Genre : *Candida*

Espèce : *Candida albicans*

Et la classification selon la reproduction sexuée:

Règne : *Fungi*

Division : *ascomycotina*

Classe : *saccharomycetes*

Ordre : *saccharomycetales*

Famille : *saccharomycetaceae*

Genre : *Candida*

Espèce : *Candida albicans*

1.5 Habitat :

Les levures du genre *Candida* sont habituellement à l'état commensale au niveau du Tube digestif, muqueuse ORL, cavité vaginale (*C. albicans* et *C. glabrata*),

De nombreuses espèces vivent dans les milieux extérieur et peuvent se retrouver accidentellement dans le tube digestif suite à leurs ingestions : *C. krusei* (jus de raisin)

C. kefir (produits laitiers fermentés)(Sullivan et al., 1998).

1.6 Pouvoir pathogène :

Le genre *Candida* regroupe des levures non pigmentées, non capsulées, à bourgeonnement multilatéral, productrices ou non de mycélium et pseudo mycélium. De nombreuses espèces ont un rôle pathogène reconnu chez l'homme. La plus fréquente est *Candida albicans*, commensal des cavités naturelles. D'autres espèces se retrouvent en commensal, aussi bien sur les muqueuses que sur la peau saine (*Candida glabrata*, *C.krusei*, *C.tropicalis*, *C.parapsilosis*, ...) (Anofel, 2002)

2. *Staphylocoque aureus* :

2.1 Définition :

Les *staphylocoques* sont des coques à gram positif, immobiles, non capsulés et non sporulé, il sont le plus souvent regroupés en « grappe de raisin », il sont aero-anaérobies, leur pH optimal de croissance est neutre ou alcalin (entre 6 et 9) et la température optimal est entre 15 et 45°C (il sont mésophile et psychrophiles), il résiste bien à la dessiccation pendant plusieurs mois. Il sont catalase positifs, oxydase négative, réduisent les nitrates et sont

Capables de fermentation de glucose, ils produisent également des coagulas, des phosphatases alcalines et d'autres enzymes

Le germe présente une forte résistance aux agents désinfectants et antiseptiques, plusieurs *staphylocoques* peuvent coloniser l'organisme de l'homme : *S.aureus*, *S.epidermis*, *S.saprophyticus* (**Figure 07**) (**Carip et al., 2015**).



Figure 07. Couques de *Staphylococcus aureus* disposées en grappes de raisins ; micrographie électronique à balayage (Gx100) (**Willey et al., 2010**).

2.2 Historique :

Ennemi intime et permanent depuis la nuit des temps, le *Staphylocoque* fut démasqué à la fin du XIX^{ème} siècle, l'observation au microscope faisant apparaître des « amas de grains » dans le pus de furoncles. D'abord observé par Robert Koch en 1878, il fut reconnu par Louis Pasteur deux ans plus tard (**Fasquelle, 1974 ; Karthik, 2007**). En 1881, **ALEXANDER OGSTON** isola la bactérie à partir d'abcès post-opératoires et reproduisit l'infection chez l'animal. Ces amas furent à l'origine du nom qu'il lui donna, Staphyle désignant la grappe de raisin en grec. OGSTON différencie ainsi *Staphylococcus* de *Streptococcus* (**Spicer, 2003 ; Breche, 1988 ; Stephen et Haxkey, 2006**). Et ce fut en 1884 qu'ANTON ROSENBACH cultiva le *Staphylocoque* in vitro et en décrivit la première espèce connue : *Staphylococcus aureus*, ou bien *Staphylocoque doré*, ainsi nommé en raison de la couleur des colonies obtenues en culture (**Avril et al., 1992 ; Karthik, 2007**).

2.3 Classification :

Il existe plusieurs types de classification de *Staphylocoque* dont la plus utilisée est la Classification de BERGEY (**Camille, 2007**)

Domaine : *Bacteria* ou *Eubacteria*.

Phylum XIII : *Firmicutes*.

Classe : *Bacilli*.

Ordre : *Bacillales*.

Familles : *Staphylococcaceae*.

Genre : *Staphylococcus*

Espèce : *Staphylococcus aureus*.

2.4 Habitat et épidémiologie :

Le bon exemple est *S.aureus*, qui est commensal de la peau et des muqueuses de nombreux mammifères, y compris l'homme. On le trouve surtout dans les fosses nasales et le pharynx (20 à 50 % des individus), dans le tube digestif et sur les téguments des grands plis et du périnée. Il se trouve aussi comme saprophyte dans l'environnement.

La bactérie est un pathogène opportuniste, avec un pouvoir invasif et toxique. Elle développe souvent des résistances aux antibiotiques, ce qui en fait actuellement l'un des germes les plus résistants et l'un des vecteurs les plus dangereux d'infection nosocomiales. Par ailleurs, *S.aureus* est responsable de toxi-infection alimentaire, provoquée par ses enterotoxines (Carip et al., 2015).

2.5 Pouvoir pathogènes :

Staphylocoque adhère fortement au substrat par des adhésions, une fois dans les tissus, il sécrète de l'hyaluronidase, enzyme qui lui permet la propagation dans les tissus. *S.aureus* sécrète plusieurs toxines, l'hémolysine et la leucocidine lui permettent de neutraliser et détruire les cellules sanguines ; la toxine exfoliative provoque le décollement des couches de l'épiderme les unes des autres avec apparition de lésion bulleuse ; l'entérotoxine, en fait sept types de molécules thermostables dont la plus impliquée dans les gastro-entérites est l'entérotoxine B et la toxine du choc septique staphylococcique (TSST), avec effet pyrogène, provoque l'activation massive de la réaction inflammatoire avec possible choc dû aux molécules actives libérées en excès (Carip et al., 2015).

Partie II :

Méthodologie

1. Objectifs :

Beaucoup d'études ont été réalisées au sujet de l'activité antimicrobienne des extraits de plantes ayant des vertus thérapeutiques dans des journaux spécialisés de microbiologie ou présentées lors de congrès scientifique d'aromathérapie ; L'expérimentation a été orientée pour l'étude des effets antimicrobiens des extraits éthanolique du Miswak riches en multiples composés bioactifs sur quelques germes de référence tels que *Candida albicans* (ATCC 10234) et *Staphylococcus aureus* (ATCC33862).

D'une façon générale les objectifs escomptés à travers cette étude expérimentale s'articulent autour de 5 points essentiels ;

- 1- Procéder à l'extraction à l'éthanol aqueux, de la plante *Salvadora persica*
- 2- Suivre les effets antibactériens in vitro de l'extrait de *Salvadora persica* vis-à-vis de *Candida albicans* et *Staphylococcus aureus* par la méthode de contact direct sur milieu solide.
- 3- Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de l'extrait de la plante étudiée vis-à-vis de *Candida albicans* et *Staphylococcus aureus*.
- 4- Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) de l'extrait de la plante étudiée vis-à-vis de *Candida albicans* et *Staphylococcus aureus*.

2. Régions de prélèvement et traitements préliminaires des échantillons :

La matière végétale *Salvadora persica* a été récoltée à partir de (05) arbustes ; prélevés, respectivement, d'une manière aléatoire, dans la région d'Arak, à Ain Salah au Sud d'Algérie, située à 30 .70 ' Est de longitude et à 250 .28' Nord de latitude (**Figure 08**).

Une fois prélevés, les arbustes de Miswak sont par la suite coupés en bâtonnets de tige et de racine de 10 à 12 cm de longueur, étalés sur du papier journal, séchés à l'air ambiant durant deux semaines, puis traités aux rayons UV dans une hôte afin de détruire tous germes de contamination et enfin stockés à -18°C jusqu'aux analyses ultérieures.

3. Climat de la région :

In Salah est une ville du Centre du pays, située au cœur du [Sahara Algérien](#). Elle dépend administrativement de la [wilaya de Tamanrasset](#) et elle les caractérisées par les données climatiques suivantes (**Tableau 01**).

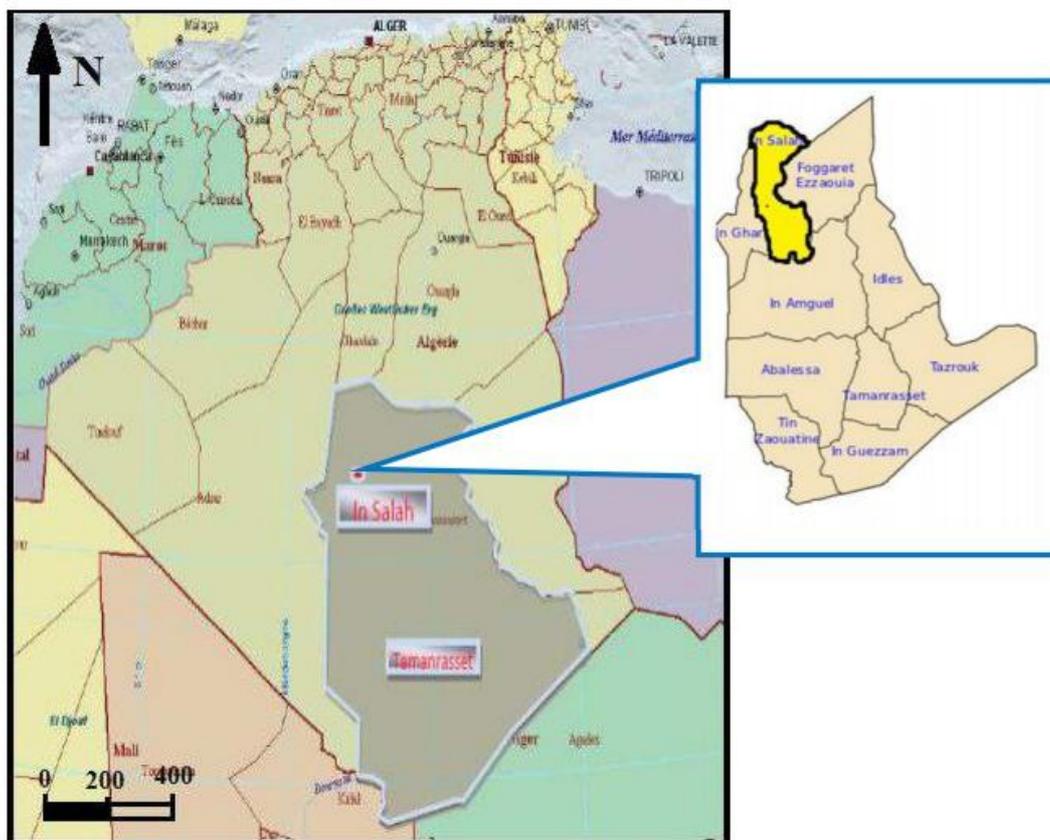


Figure 08. Carte géographique de la région de récolte de l'espèce *Salvadora persica* (Willaya de In Salah)

Tableau 01. Climatologie globale à In Salah (2000-2015)

Données climatiques à In Salah (climat désertique chaud - zone saharienne hyper-aride)

Mois	jan.	fév.	mars	avril	mai	juin	juil.	août	sep.	oct.	nov.	déc.	année
Température minimale moyenne (°C)	7,2	9,6	14,2	18,1	23,3	27,5	30,6	30,2	26,7	21,3	13,1	8,9	19,28
Température moyenne (°C)	14,7	17,2	22,4	26,6	31,4	35,7	38,5	37,8	34,3	28,8	20,6	16	27,05
Température maximale moyenne (°C)	22,2	24,9	30,5	35,2	39,6	43,8	46,4	45,3	41,9	36,2	28	23,2	34,83
Précipitations (mm)	3,1	0	6,2	9	3,1	3	0	3,1	3	3,1	0	0	14,1
Humidité relative (%)	41,3	35	27,2	22,8	17,9	13,1	11,9	12,4	16,2	23,5	30,9	41,9	24,51

4. Préparation d'échantillon :

Les rameaux de la tige de l'espèce végétale *Salvadora persica* sont tout d'abord séchés, puis coupés en petits morceaux, en suite broyés à l'aide d'un broyeur et tamisés sur un tamis de 1mm de diamètre.

5. Matériels ;

5.1 Matériel et produits chimiques utilisés :

Dans la présente étude le matériel et produits chimiques utilisés sont comme suit :

Milieux de cultures	Verrerie	Appareil	Autres matériels
Gélose Muller	Béchers	Autoclave	Aluminium
Hinton	Boites petri	Balance	Anse de platine
Gélose nutritif	Entonnoir	Bain marie	Bec bensen
Bouillon Muller	Erlenmeyer	Etuve	Disque en papiers stérile
Hinton	Flacons, Fioles	Rota vapeur	(6mm)
Bouillon nutritif	Tubes à essais	Plaque chauffante	Papier wathmann n°3
	Verre de montre	Pour Spectrophotomètre	Papier filtre stérile
	Mesure		

6. Méthodes utilisés :

6.1 Extractions des composés bioactifs de *Salvadora persique* :

L'extraction des principaux composés bioactifs a été effectuée uniquement sur la tige de la plante, qui s'avère contenir a priori plus de polyphénols que la racine et l'écorce. L'extraction de ces composés bioactifs de la tige a été réalisée par usage d'un solvant polaire à savoir l'éthanol. Elle a été effectuée sur des prises d'échantillons de 10 g en triples répétitions de matière végétale broyée. Chaque échantillon de poudre de tige de *Salvadora persica* a été mélangé avec 100 ml de solvant aqueux (80/20, solvant / eau, v / v). L'extraction par macération à froid de chaque mélange est laissée ensuite se poursuivre pendant 6 heures à température ambiante sous agitation. La durée de l'extraction favorise ainsi la dépolymérisation des principaux composés constitutifs de la plante tels que la lignine ainsi que les substances pectiques et permet une meilleure solubilisation des principaux composés bioactifs. Les extraits hydro alcooliques ont été filtrés en utilisant un papier filtre Whatman ayant une porosité de 0,2µm et débarrassés du solvants par évaporation sous vide à 45 °C (Sultana et al., 2009). Les extraits purs riches en composés bioactifs récupérés ont été enfin dilués à l'eau distillée stérile à des taux variables de 0, 20, 40, 60, 80 et 100%, respectivement. Les effets antimicrobiens de ces solutions expérimentales ont été enfin testés sur plusieurs germes pathogènes à savoir *Candida albicans* et *Staphylococcus aureus*.

6.2 Etude des effets antimicrobiens des extraits de *Salvador persica* :

6.2.1 Activation des inocula microbiens :

L'étude concerne les deux souches pures de références et spécifiques à savoir *Candida albicans* et *Staphylococcus aureus*. Chaque espèce et tout d'abord activée avant son utilisation expérimentale. Une prise de 0.25 g de la souche lyophilisée conservée au froid à 4°C est au préalable ensemencée dans 10 ml de bouillon nutritif, puis incubée à 37°C durant 03 heures. 0,1 ml de cette dernière solution constituant l'inoculum bactérien a été pris pour être ensemencée en surface d'une boîte de Petri contenant un milieu spécifique gélosé de croissance pour chaque espèce microbienne milieu gélosé MH puis le mélange est incubé à 37°C pendant 24 heures (**Figure 09**).

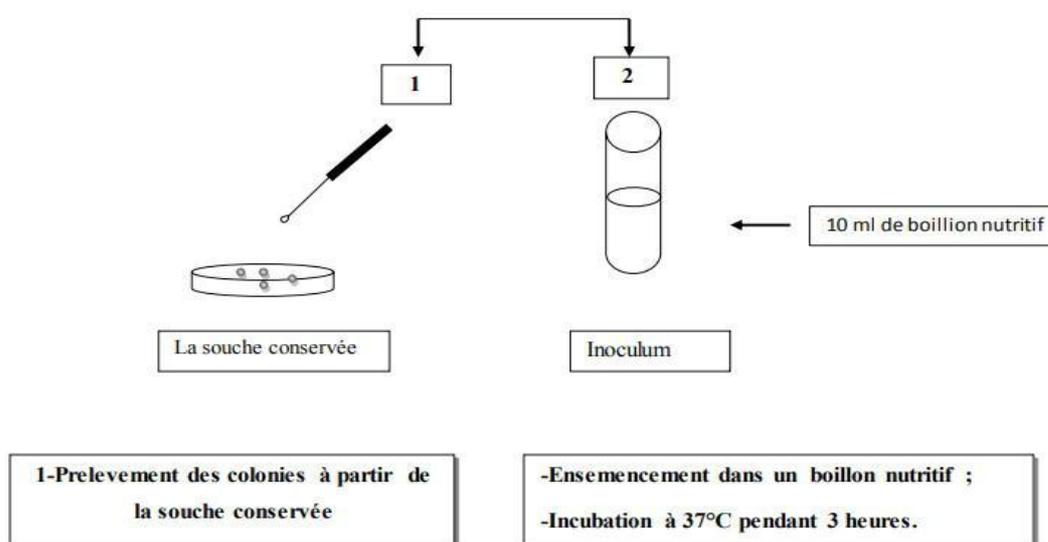


Figure 09. Méthode d'Activation de la souche bactérienne étudiée

6.2.2. Méthode de contact direct (Bourgeois et Leveau, 1980):

Une colonie issue d'une culture jeune de chaque espèce microbienne activée comme préalablement sur milieu solide gélosé spécifique ont été prélevée à l'aide d'une anse à platine stérile, chacune et ensuite ensemencée dans un tube contenant 10 ml de bouillon nutritif, suivi d'une incubation à 37°C durant 03 heures. A partir de ces dernières solutions dont chacune constitue la solution mère d'une espèce de bactérie étudiée donnée, des dilutions décimales isotopiques croissantes dans l'eau physiologique ont été effectuées ; allant à 10^{-5} pour respectivement les espèces *Candida albicans* et *Staphylococcus aureus*. Des prélèvements de 01 ml de chaque dernière dilution décimale ont été ensuite individuellement ajoutés à 09 ml

De chaque extrait de *Salvadora persica* dilué à l'eau distillée, respectivement, à raison de 0, 20, 40, 60, 80 et 100% (**Figure 10**).

Les mélanges des solutions ont été enfinensemencés en triple essais (03 boîtes de Pétri) chacune en surface à raison de 0.1 ml sur le milieu spécifique de croissance pour chaque espèce microbienne. La lecture du nombre de colonies développé a été effectuée après incubation des milieux ensemencés à 37°C pendant 24, 48 à 72 heures (**Bourgeois et Leveau, 1980**).

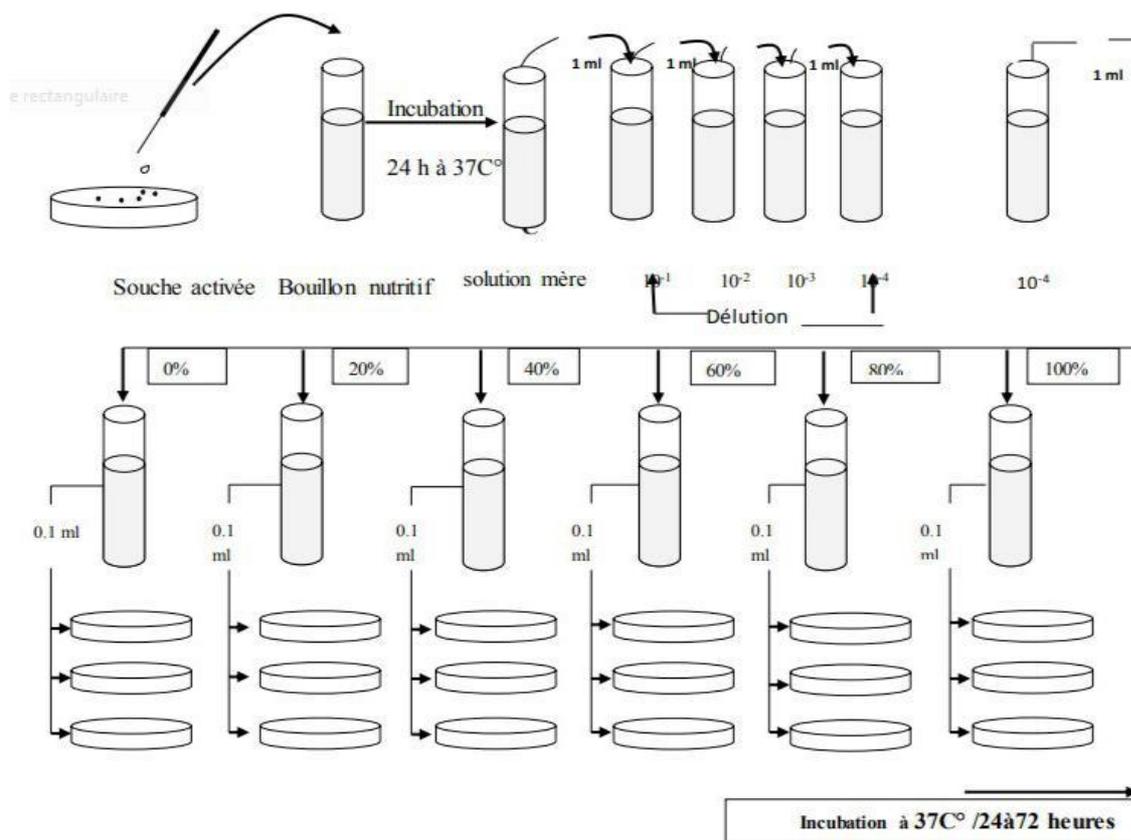


Figure 10. Méthode de contact direct

6.2.3 Méthode des disques par diffusion sur gélose :

Les disques ont été confectionnés à partir de papier filtre (Whatman n° 3), à raison de 6mm de diamètre. Pour éviter tous risques de contamination aux germes exogènes au cours de l'expérimentation les disques ont été stérilisés à 120°C pendant 15 minutes dans un autoclave.

Une colonie de chaque espèce pathogène prélevée du milieu gélosé spécifique après activation a été ensemencée dans 10 ml de bouillon nutritif ; ce mélange a constitué la solution mère. Des prises de volume de 1ml de cette dernière solution ont été étalées

Séparément en surface de plusieurs boîtes de Pétri contenant le milieu MH selon l'espèce microbienne étudiée. Trois disques imbibés pendant 5 minutes dans chaque extrait obtenu selon le solvant utilisé, ainsi que dans une solution contenant un puissant antibiotique dont la Gentamycine, ont été ensuite déposés successivement à la surface de chaque boîte de Petri contenant le milieu gélosé spécifique ensemencé au germe pathogène approprié (**Figure 11**) (**Prescott et al., 2003**).

La lecture des diamètres d'inhibition a été après incubation des boîtes de Petri à 37°C pendant 24, 48 à 72 heures à l'aide d'un pied à colis (**Guignar, 1998**).

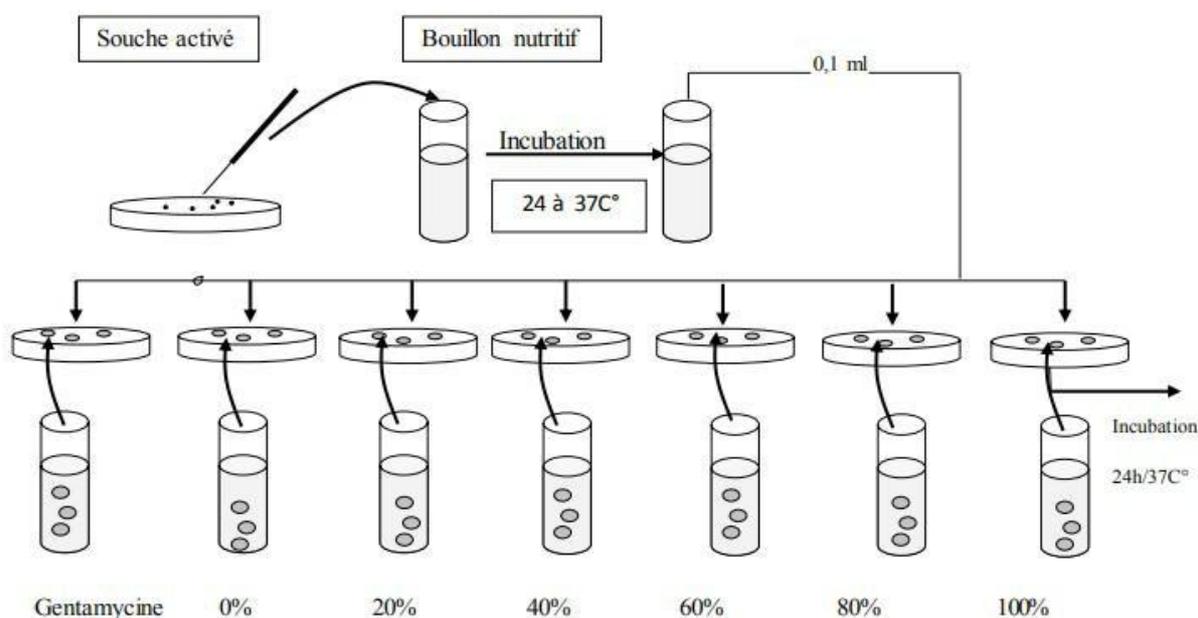


Figure 11. Méthode des disques par diffusion sur milieu de Muller Hinton.

6.2.4 Détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI :

La concentration minimale inhibitrice est la plus petite concentration en antibiotique, en antifongique et /ou en principes composés actifs nécessaires pour inhiber la croissance d'un microorganisme (**Denis et al., 2011**).

Dans le cas de notre étude, c'est les principes actifs des extraits de la matière végétale de MISWAK obtenus par extraction à l'éthanol aqueux qui est utilisés pour déterminer la concentration minimale inhibitrice des espèces de germe spécifiques *Candida albicans* et *Staphylococcus aureus*. Ainsi, une colonie jeune de *C.albicans* ou de *S.aureus* prélevée à l'aide d'une anse à platine dans 10 ml de bouillon nutritif et incubée pendant 03 heures à

37°C en vue d'obtenir les inocula. Des prises de 0,2 ml de chaque inoculum ont été introduites respectivement dans 2 ml de chaque extrait dilué non pas avec de l'eau mais avec le bouillon Mueller Hinton (**Figure 12**).

Les mélanges des tubes contenant séparément chaque extrait préparé à différentes concentrations (0, 20, 40, 60, 80 et 100%) et l'inoculum de bactérie étudié ont été ensuite incubés à 37 °C pendant 18 à 24 heures (**Moroh et al., 2008**).

La détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI a été effectuée à partir de la mesure de la turbidité induite par la croissance du microorganisme étudié. La CMI correspondra donc à la plus petite concentration pour laquelle il y a absence de turbidité. Par conséquent c'est le premier tube où la valeur d_i sera égale à df ($d_i = df$).

Le taux de survie du microorganisme sera mesuré au spectrophotomètre réglé à 560 nm comme suit :

$$s = \frac{df - d_i}{Df - Di} \times 100. \frac{df - d_i}{Df - Di}$$

- S : Taux de survie du microorganisme en %.
- df-di : différence de densité optique dans la solution phénoliqueensemencée avant et après incubation à 37°C durant 18 heures.
- Df-Di : différence de densité optique sans extraits de MISAWAK avant et après incubation à 37°C durant 18 heures (**Kra et al., 2001 ; Zrihiet al., 2007**).

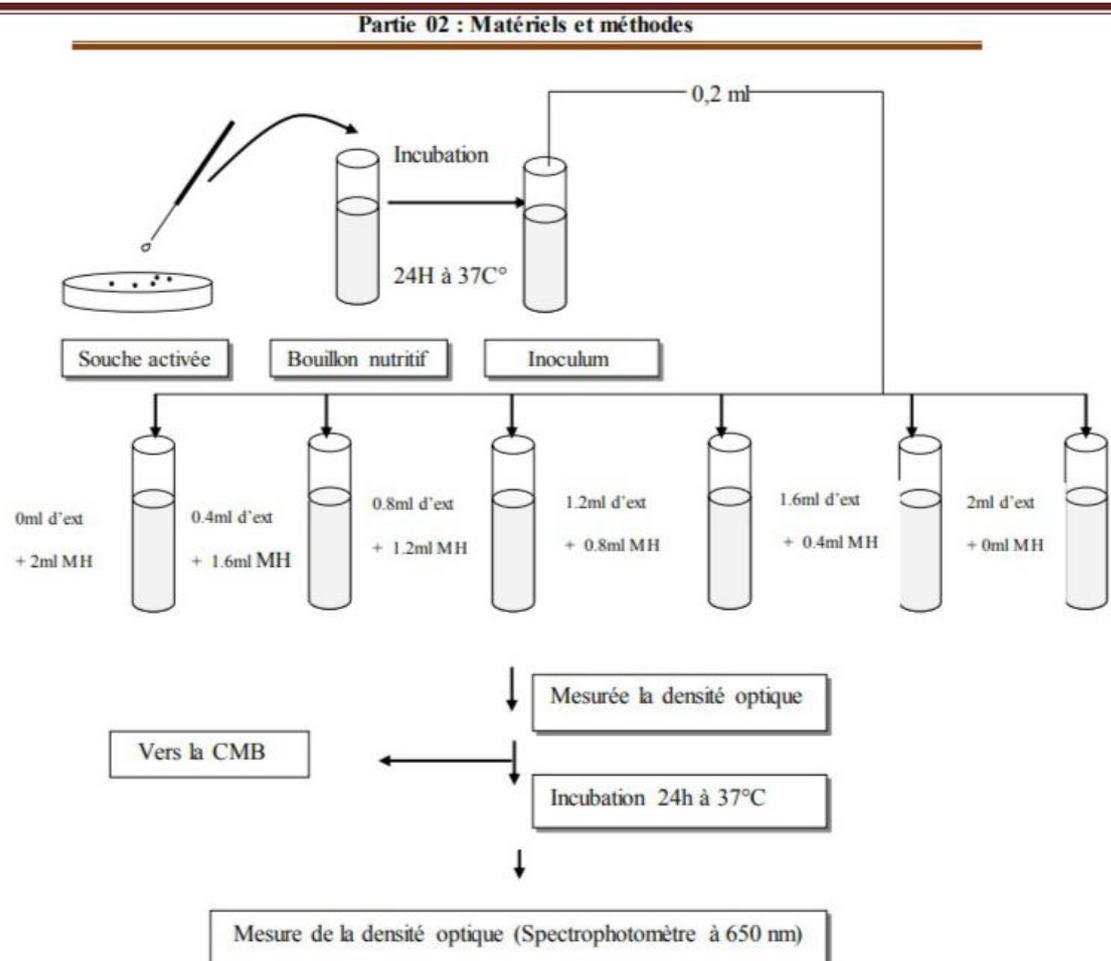


Figure 12. Concentration Minimale Inhibitrice(CMI).

6.2.5 Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) :

La concentration minimale bactéricide des espèces étudiés représente la plus petite concentration d'extrait de la plante qui laisse 0,01% au moins de survivant de l'inoculum initial après incubation (**Moroh et al., 2008**).

Pour sa détermination, le tube témoin (inoculum) a été dilué à l'eau physiologique jusqu'à 10^{-4} . Cette dilution représente 0,01% de survie du microorganisme. Elle estensemencée par strie de 5 cm sur une Gélose Mueller Hinton puis incubée à 37°C pendant 24 heures. Le nombre de colonies de bactéries obtenu sur la strie de la dilution 10^{-4} est comparé à celui de chaque tube expérimental contenant l'inoculum, égalementensemencé sur le même milieu de culture en strie de 5cm et incubé à 37 °C durant 18 à 24 heures. Ainsi, le premier tube expérimental dont le nombre de colonies présent sur sa strie est inférieur ou égal à celui de la dilution 10^{-4} correspondra à la CMB (**Figure 13**).

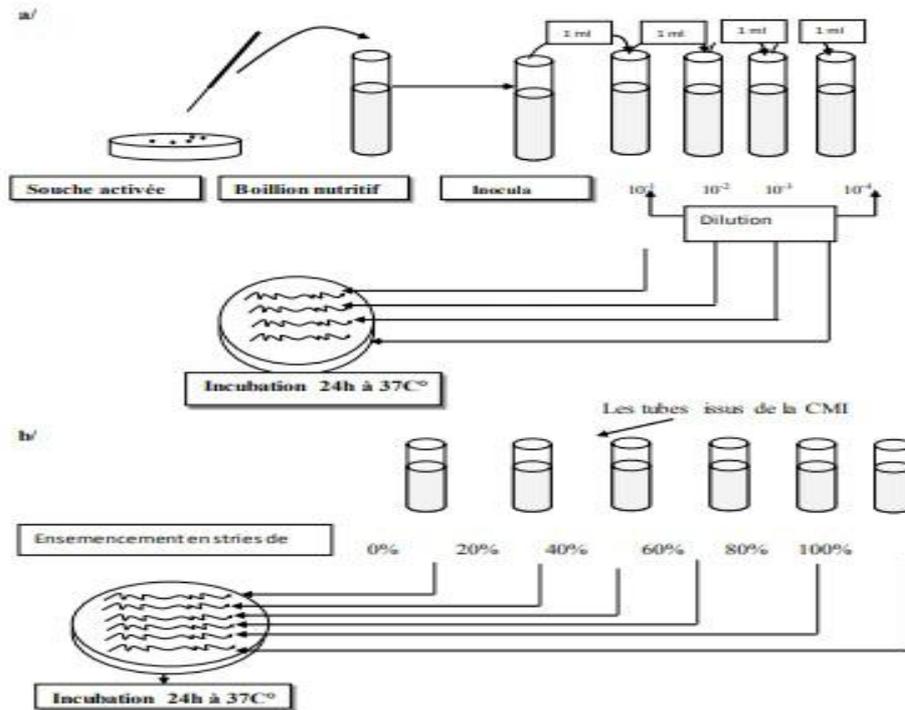


Figure 13. Principales étapes de la détermination de la CMB

6.2.6 Calculs statistiques :

Les résultats obtenus ont subi une analyse de variance monofactorielle en randomisation totale, suivie d'une comparaison des moyennes deux à deux selon le test de Newman et Keuls (**Stat box 6.4**). Les groupes homogènes de comparaison des moyennes ont été révélés aux deux seuils de probabilité : à $p < 0.05$ et à $p < 0.01$.

Partie 03 :

Résultats et Discussion

1. Résultats :

1.1 *Candida albicans*

Les diamètres d'inhibition effectués par la méthode des disques est développés pour les différentes concentrations d'extrait hydro-éthanolique de *Salvadora persica* sur la croissance de la souche *C.albicans* sont illustrés dans le (**Tableau 02**).

Le faible diamètre d'inhibition chez *C.albicans* a été réalisé avec l'extrait de la plante concentré à 20% et 40% ($p<0.01$) ; 06.67et 07.00 mm, respectivement.

Les solutions d'extrait préparées à 60 et 80% ont occasionné des diamètres d'inhibitions de l'espèce fongique étudiée comparables mais beaucoup plus élevés que la concentration d'extraits précédente ; (11.33mm en moyenne, respectivement).

La meilleure zone d'inhibition a été obtenue avec l'extrait de SIWAK préparé à 100% (14.00mm de moyenne). Cependant, la Fungizone a noté un diamètre d'inhibition remarquablement élevé ($p<0.01$) a ce de tous les solutions d'extrait expérimentaux de Miswak (18.67mm)

L'analyse de variance a montré l'effet hautement significatif des différentes concentrations d'extrait hydro-éthanol de *Salvadora persica* sur la variation des diamètres d'inhibition chez *C.albicans*.

Les taux d'inhibition de *Candida albicans* les plus faibles ($P<0.05$) ont été réalisés avec la dilution d'extrait de *Salvadora persica* de 20 et 40% ; 35.67 vs 37.43 %. Les extraits préparé à 60 et 80% on induit des résultats beaucoup plus important comparativement à la solution précédente ($P<0.01$) ; 60.68%, en moyenne. Enfin, la solution d'extraction préparé à 100% à montré un taux d'inhibition d'environ 64.17 % sur la croissance de ce germe.

Les effets des différentes solutions d'extrait de *Salvadora persica* sur la croissance de *Candida albicans* a montré un abaissement remarquable de la croissance du germe étudié dans l'extrait préparé à 20% ($p<0.01$) ; avec un nombre de germes de 84.10^4 UFC/ml contre 115.10^4 UFC/ml dans la solution témoin. Par ailleurs, les solutions d'extrait préparées à 40, 60, 80 et 100% ont exercé une action fongicide sur l'espèce étudiée et aucun développement de *Candida albicans* n'a été observé.

L'espèce microbienne *Candida albicans* objet de l'étude ne semble pas croître sur milieu liquide Muller Hinton contenant un taux d'extrait à l'éthanol de *Salvadora persica* de 40 % ; avec un taux de survie proche de Zéro. C'est à partir de l'extrait préparé à 40% que la

Croissance de *Candida albicans* s'annule d'une manière absolue ; cette concentration a été retenue comme étant la concentration minimale inhibitrice.

L'extrait à 40% a engendré un pourcentage de survie proche de 0.01 de l'espèce microbienne expérimentale ; cette solution d'extrait hydroéthanolique de miswak constitue donc la CMF.

Il résulte enfin, à partir du rapport CMF /CMI obtenu et qui est égale à 01 que l'extrait à l'éthanol queux de *Salvadora persica* exerce un effet inhibiteur de type Fongicide chez l'espèce étudiée *Candida albicans* (Tableau 02).

Tableau 02. Effets antimicrobiens de l'extrait hydroéthanolique de *Salvadora persica* sur la croissance de *candida albicans*.

Germes	Mesures	Fungizone	Concentrations de l'extrait à l'éthanol aqueux de <i>Salvadora persica</i>						Effets des différentes solutions
			100%	80%	60%	40%	20%	0% Témoin	
C. albicans	Diamètre d'inhibition (mm)	18.67 ^a ± 02.08	14.00 ^b ± 00.00	11.33 ^{bc} ± 01.16	11.33 ^{bc} ± 01.16	07.00 ^c ± 01.00	06.67 ^c ± 01.15	18.67 ^a ± 02.08	P<0.01
	Taux d'inhibition (%)	-	64.17 ^a ± 00.00	60.68 ^{ab} ± 05.78	60.68 ^{ab} ± 05.78	37.43 ^b ± 05.35	35.67 ^b ± 00.10	-	P<0.05
	Croissance (UFC/ml)	-	0 ^c	0 ^c	0 ^c	0 ^c	84 10 ^{4b}	115 10 ^{4a}	P<0.01
	CMI		40						
	CMF		40						
	Rapport CMF/CMI		1						
	Type d'inhibition		Fongicide						

Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes plus ou moins écarts types correspondants, avec un nombre de répétitions n égal à 05 ; mg EAG : milligramme équivalent acide gallique ; Témoin : Eau (0MEAG/ml) ou Gentamicine ; CMI : Concentration Minimale Inhibitrice ; CMB : Concentration Minimale Bactéricide ; a,b,c,d,e : Groupes homogènes de comparaison des moyennes deux à deux selon le test de Newman et Keuls.

1.2 *Staphylococcus auerus* :

Les résultats des tests antimicrobiens des différentes solutions d'extrait hydroéthanolique de *Salvadora persica* sur la croissance de *Staphylococcus aureus* sont représentés dans le (Tableau 03).

Les faibles diamètres d'inhibition chez *Staphylococcus aureus* ont été enregistrés avec les solutions d'extrait concentrées à 20, 40 et 60% ($p < 0.01$) ; 08.33 ; 08.33 et 09.66 mm, respectivement. L'extrait préparé à 80% a montré un diamètre d'inhibition chez l'espèce microbienne étudiée comparable mais beaucoup plus élevé que les concentrations en extrait de la plante précédentes ; 13.33mm de moyenne. La meilleure zone d'inhibition a été obtenue avec l'extrait de SIWAK préparé à 100% (16.00mm de moyenne). Toutefois, la Gentamicine a noté un diamètre d'inhibition remarquablement plus élevé ($p < 0.01$) (33.00mm de moyenne) par comparaison à ceux des solutions d'extrait de *Salvadora persique* étudiées.

Le taux d'inhibition de *Staphylococcus aureus* le plus faible ($P < 0.01$) a été réalisé avec les dilutions d'extrait à l'éthanol aqueux de *Salvadora persica* préparées à 20, 40 et 60% ; 25.37 ; 25.43 et 29.42%, en moyenne respectivement. L'extrait préparé à 80% a induit des résultats beaucoup plus importants comparativement à la solution précédente ($P < 0.01$) ; 40.37%, en moyenne. Enfin, la solution d'extraction préparé à 100% a montré un taux d'inhibition d'environ 51.06% sur la croissance de ce germe.

Un abaissement remarquable de la croissance du germe étudié a été enregistré dans les solutions d'extrait préparées à 20 ; 40 et 60% ($p < 0.01$) ; avec un nombre de germe de (68.10_6 UFC/ml ; 39.10_6 UFC/ml et 18.10_6 UFC/ml respectivement contre 76.10_6 UFC/ml dans la solution témoin sans extrait de SIWAK ; Par ailleurs, les solutions d'extraits préparées à 80 et 100% ont exercé une action bactéricide sur l'espèce étudiée ; ainsi aucun développement de *Staphylococcus aureus* n'a été remarquée.

L'espèce microbienne *Staphylococcus aureus* objet de notre étude ne semble pas croître sur milieu liquide Muller Hinton contenant un taux d'extrait à l'éthanol aqueux de *Salvadora persica* de 80 % ; avec un taux de survie proche de Zéro. C'est à partir de l'extrait préparé à 80% que la croissance de *Staphylococcus aureus* s'annule d'une manière absolue ; cette concentration a été considérée comme étant la concentration minimale inhibitrice.

L'extrait à 80% a engendré un pourcentage de survie proche de 0.01 de l'espèce microbienne expérimentale ; cette solution à l'extrait de l'éthanol de miswak constitue donc la CMB chez *Staphylococcus aureus*.

Il résulte enfin, à partir du rapport CMB /CMI égale à 01 que l'extraithydro-éthanolique de *Salvadora persica* exerce aussi un effet inhibiteur de type Bactéricide chez l'espèce étudiée *Staphylococcus aureus*.

Tableau 03. Effets antimicrobiens de l'extrait hydroéthanolique de *Salvadora persica* sur la croissance de *Staphylococcus aureus*.

Germes	Mesures	Gentamicin E	Concentrations de l'extrait à l'éthanol aqueux de <i>Salvadora persica</i>						Effets des différentes solutions
			100%	80%	60%	40%	20%	0% Témoin	
S. aureus	Diamètre d'inhibition (mm)	33.00 ^a ± 02.00	16.00 ^b ± 00.00	13.33 ^c ± 01.15	9.66 ^d ± 0.52	8.33 ^d ± 0.57	8.33 ^d ± 0.57	-	P<0.01
	Taux d'inhibition (%)	-	51.06 ^a ± 3.24	40.37 ^b ± 1.88	29.42 ^c ± 03.36	25.43 ^c ± 03.20	25.37 ^c ± 03.23	-	P<0.01
	Croissance (UFC/ml)	-	0 ^c	0 ^c	18 10 ^{6c}	39 10 ^{6b}	68 10 ^{6a}	76 10 ^{6a}	P<0.01
	CMI	80							
	CMB	80							
	Rapport CMB/CMI	1							
	Type d'inhibition	Bactéricide							

Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes plus ou moins écarts types correspondants, avec un nombre de répétitions n égal à 05 ; mg EAG : milligramme équivalent acide gallique ; Témoin : Eau (0MEAG/ml) ou Gentamicine ; CMI : Concentration Minimale Inhibitrice ; CMB : Concentration Minimale Bactéricide ; a,b,c,d,e : Groupes homogènes de comparaison des moyennes deux à deux selon le test de Newman et Keuls.

2. Discussion:

L'extrait hydroéthanolique de *Salvadora persica* a montré des effets antimicrobiens intéressants vis-à-vis des germes pathogènes *Candida albicans* et *Staphylococcus aureus* impliqués dans les multiples infections buccodentaires (parodontites, gingivites, caries dentaires et candidoses).

A ce propos, le Miswak (*Salvadora persique*) a de multiples composés bioactifs ayant des propriétés particulières citées par de nombreux auteurs dont antibactériennes, antioxydant (Noumi et al., 2010), antiviral, analgésique, anti-inflammatoire, anti-pyrétique, diurétique (Galletti et al., 1993), anti-caries, anti-maladies parodontales et antifongiques (Al-Bagieh et Almas et al., 1997).

L'analyse de la composition chimique chez cette espèce végétale a montré qu'elle renferme de nombreuses substances ayant des activités antimicrobiennes variables d'une espèce microbienne à une autre incluant les composés phénoliques (tannins et flavonoïdes) (Farooqui et Sriastava, 1968), les glucosides ainsi que les composés sulfurés (Kamel et al., 1992), le β sitostérol, le Salvadourea [1,3-bis-3 - Méthoxy-benzyle-urée] et l'acide m-anisique (Ray et al., 1975) .

Plusieurs auteurs préconisent ainsi l'utilisation du Miswak comme moyen efficace pouvant assurer l'hygiène buccale et indiquent même que les extraits de la plante préparés notamment à de fortes concentrations présentent des effets comparables sinon meilleurs par comparaison à d'autres désinfectants oraux et agents anti plaque dentaire usuellement commercialisés (Almas et al., 2002 et Almas et al., 2006).

L'analyse de la CMI et CMF a montré que *Candida albicans* est sensible à 40% d'extrait à l'éthanol avec un rapport de (CMF / CMI=1). D'après (Oliver, 2007) étant donné que ce rapport est inférieur ou égale à 2 l'extrait de la plante testé exerce donc un effet de type fongicide. Des études in-vitro réalisées par (Al-Bagieh, 1994 et Al-Lafi, 1995) sur la flore buccale montrent aussi que le Miswak empêche la croissance de plusieurs bactéries aérobies et anaérobies, ainsi que de *Candida albicans*.

La concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB) chez *Staphylococcus aureus* ont été obtenues avec la solution d'extrait préparée à 80%. Cet extrait dont l'action inhibiteur est deux fois moindre que la pénicilline G s'avère exercer un effet antimicrobien de type bactéricide chez cette espèce bactérienne (Marmonier, 1990 ; Denis et al., 2011). *Staphylococcus aureus* s'avère donc très sensible à des solutions

D'extraits préparés à 80 et 100%. D'après (**Firas et al., 2007**) l'extrait à l'eau de *Salvadora persica* a été reconnu comme ayant une profonde activité inhibitrice contre l'espèce *Staphylococcus* par rapport à d'autres solvants d'extraction.

D'après (**Yarbrough et al., 1980**) les principaux composés bioactifs antimicrobiens de *Salvadora persica* peuvent agir surtout en bloquant le transport actif de la proline et des aldolase chez *Streptococcus faecalis* tout en empêchant l'activité du transport phospho-oxydatif ainsi que de la consommation d'O₂ chez les *Staphylococcus aureus*.

Il faut rappeler que l'activité de tels extraits du végétal dépend de plusieurs facteurs dont le mode d'extraction, le type des solvants utilisés et les concentrations en principes actifs appliquées (**Wagner, 1993**).

Conclusion générale:

CONCLUSION

Conclusion :

Au terme de cette étude et à travers les résultats obtenus, il apparaît que l'extrait de la tige de *Salvadora persica* exerce in vitro des effets antibactériennes très élevés vis-à-vis de la prolifération des deux souches pathogènes (*Candida albicans* et *Staphylococcus aureus*) impliquées dans les multiples infections buccodentaires.

Le degré d'inhibition s'avère dépendre de la concentration de l'extrait utilisé. Ainsi, plus la concentration d'extrait est importante plus le degré d'inhibition des deux germes est considérable.

Le diamètre d'inhibition le plus élevé est obtenu avec l'extrait préparé à 100% ($P < 0.01$) chez *Candida albicans* et *Staphylococcus aureus*.

Les meilleurs taux d'inhibition de *Candida albicans* et *Staphylococcus aureus* ont été aussi obtenus avec l'extrait de SIWAK concentré à 100% ou aucune prolifération des deux microorganismes étudiés n'a été observée.

La concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale fongicide (CMF) ont été réalisées chez *Candida albicans* à 40% d'extrait hydriéthanolique de miswak. En revanche, la CMI et la concentration minimale bactéricide (CMB) chez *Staphylococcus aureus* ont été enregistrées avec la solution d'extrait préparée à 80%. Ces résultats ont dévoilé, par ailleurs, que l'extrait de la tige de *Salvadora persica* a exercé une action de type bactéricide chez *Staphylococcus aureus* et une action de type fongicide vis-à-vis de *Candida albicans*.

En perspectives on suggère d'orienter les efforts à la recherche de nouvelles molécules bioactives naturelles des plantes médicinales autochtones comme le Miswak pouvant répondre aux différents problèmes de santé publique posés en Algérie en vue qu'il soient utilisées comme traitements alternatifs aux médicaments synthétiques.

Références bibliographiques :

Références bibliographiques :

Abdellah OM. Les plantes médicinales des zones arides en Mauritanie. Séminaire international ECODEV 2001 durable en zones arides et semi-arides. 2001;112-125.

Alali F, Hudaib M, Abjurai T, Kairellah K, Al-Hadidi N . GC-MS analysis et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de la tige de l'arbre brosse à dents Jordanien *Salvadora persica*. Irbideen Jordanie. Journal pharmaceutical biology. 2005 ; Vol. 42: 577-580.

Al-Ayed MSZ, Asaad AM, Qureshi MA, Attia HG, AlMarrani AH. Antibacterial Activity of *Salvadora persica* L. (Miswak) Extracts against Multidrug Resistant Bacterial Clinical Isolates. Evid Based Complement Altern Med ECAM. 2016;70-83.

Al-Bagieh NH, Idowu A, Salako NO. Effect of aqueous extract of miswak on the in vitro growth of *Candida albicans*. Microbios. 1994;80 (323):13-107.

Al-Bayati A F, Khudir D S. In vitro activité antimicrobienne de *salvadora persica* L. Université de Mossoul. Irak. 2007 : 57-62.

Al-lafi T, Ababneh H. The effect of the extract of the Miswak (chewing sticks) used in Jordan and the Middle East on oral bacteria. Int Dent J. 1995; 45:218-222.

Almas K et Al-Zeid Z. The immediate antimicrobial effect of a toothbrush and miswak on cariogenic bacteria: a clinical study. The journal of contemporary dental practice. 2004;5(1): 14-105.

Almas K, Skaug N, Ahmad I. An in vitro antimicrobial comparison of miswak extract with commercially available non-alcohol mouthrinses. Int J Dent Hyg. Retrieved on 2006; 3 (1): 18-24.

Almas K. The antimicrobial effects of seven different types of asian chewing sticks. Odonto Stomatologie tropicale = tropical dental Journal. 2001;24(96): 17-20.

Alshammary SF . Effect of saline irrigation on growth characteristics and mineral composition of two local halophytes under Saudi environmental conditions. Pak J Biol Sci. 2008 ;11: 21-216.

Aouadhi S ;. Atlas des risques de la phytothérapie traditionnelle. Étude de 57 plantes recommandées par les herboristes. Mémoire de master en toxicologie. Faculté de Médecine de Tunis. 2010.

Arbonnier M., Arbres arbustes et lianes des zones sèches d'Afrique de l'Ouest. CIRAD-MNHN. 2002 : 573 p

Association Française des Enseignants de Parasitologie-Mycologie ;. Mycologie médicale. In : AFEP, ANOFEL, parasitologie mycologie, format utile. 2002 : p 299-378.

Aumeeruddy M, G Zengin, et M Mahomoodally. A review of the traditional and modern uses of *Salvadora Persica* L. (miswak) : toothbrush tree of prophet Muhammad . Journal of ethnopharmacology. 2018;213 : 44-409.

Bahorun T, Trotin F, Pommery J, Vasseur J et Pinkas M. Antioxidant activities of *crataegus monogyna* extracts. *Planta Med.* 1994 ; 60 : 323 -328.

Benzyl isothiocyanate, a major component from the roots of *Salvadora persica* is highly active against Gram-Negative bacteria, *PLoS ONE.*2011;16(8):23045.

Bourgeois CM, Leveau JM. Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro alimentaires. Le contrôle microbiologique. Technique et documentation. *Apria* 1980 ; 3 : 331.

Bruneton J.; Pharmacognosie-phytochimie-plante-medicinals 3 eme éd. 1999.

Camille D., Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Edition lavoisier. 2007 : Pp : 156 .

Carvalho G; Gillet H;Catalogue raisonné et commenté des plantes de l'Ennedi (Tchad septentrional). Laboratoire d'agronomie tropicale du muséum national d'histoire naturelle et laboratoire central de l'office anti-Acridien.1960 : 71 p.

Chaurasia A., R Patil, et A Nagar .Miswak in oral cavity : an update ». *Journal of oral biology and craniofacial research.* 2013; 3(2): 98-101

Denis F., Ploy M-C., Martin C., Bingin É., et Quentin R., Bactériologie médicale édition Masson, Paris. 2011: 640.

Farag M., S Fahmy, M Choucry, M Wahdan, et M Elsebai. Metabolites profiling reveals for antimicrobial compositional differences and action mechanism in the toothbrushing stick "miswak" *Salvadora Persica* ». *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis.* 2017; 133: 32-40.

Farooqui MIH, Srivastava JG. The toothbrush tree (*Salvadora persica*). *J Crude Drug Res.* 1968;8: 1297-1299.

Galletti GC, Chiavari G, Kahie YD. Pyrolysis/gas chromatography/ion-trap mass spectrometry of the "tooth brush" tree (*Salvadora persica* L.). *Rap Com Mass Spectrometry.*1993; 7:651-655.

Guiraud JP. Microbiologie alimentaire. Ed Dunod.Parie.1998 ;54 -571.

- Halawany H** ;A review on miswak (*SalvadoraPersica*) and its effect on various aspects of oral health .The saudi dental journal. 2012 ;24(2) : 63-69
- Hartmann T.**, From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism, Review. *Phytochemistry*. 2007;68 :2831–2846.
- Iserin P.**, Encyclopédie des plantes médicinales. 2ème Ed. Larousse. Londres. 2001 ; Pp : 143 et 225-226
- Kamel MS, Ohtani K, Assaf MH.** Lignan glycosides from stems of *Salvadora persica*.*Phytochemistry*. 1992; 31: 2469-2471.
- Kara .**Statistical optimization of α -amylase production by *Streptomyces erumpens* MTCC 7317 cells in calcium alginate beads using response surface methodology. *Pol J Microbiol*. 2001 ;57: 49-57
- Khalid A.**; Effet d'un extraï de *salvadora persica* (Miswak) et du gluconate de chlohexidine sur la dentine humaine. *Journal of Contemp dent pract*. 2002; 3 (3) : 27-35
- Koenig H.**, Guide de Mycologie Médicale. Ellipses. Paris.1995; 284 p
- Marmonier.**, Introduction aux techniques d'étude des antibiotiques. In :*Bactériologie Médicale, Techniques Usuelles*. Doin, Paris, France. 1990: 227–236.
- Moroh J L A., C Bahi, K Dje, Y G Loukou and F. Guede-guina.**,Study of the antibacterial activity of *Morindamorindoides*(Baker) milne-redheat (rubiaceae) acetatiquextract (ACE) on in-vitro growth of *Escherichia coli* strains. *Bulletin Societe Royale des Sciences Liege*. 2008;77: 44-6.
- Niazi F, Naseem M, Khurshid Z, Zafar MS, Almas K.** Role of *Salvadora persica* chewing stick (miswak): A natural toothbrush for holistic oral health. *Eur J Dent*. juin 2016;10(2):8-301.
- Noumi E, Snoussi M, Hajlaoui H , Valentin E, Bakhrouf A .**, Antifungal properties of *Salvadorapersica* and *Juglans regia* L. extracts against oral *Candida* strains *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*.2010; 29 (1) : 81-88.
- Ozanda P.**; Flore et végétation du sahara. 2eme éd CNRC, Paris: 106 p.rinaire Hassan II. 1983.
- Prescott L M., J P Harley and D A Klein.**,*Microbiologie*. De Boeck Supérieur. 2003 pp: 1137.
- Ray AB, Chand L.,Dutta SC.** *Salvadourea*, New urea derivative from *Salvadorapersica*. *ChemInd (London)*. 1975; 12:517-518.

Renie M; Etudes sur la flore et la végétation du Sahara central. N°3 Mission du Hoggar II, Vol.1933 ; 1: 149

Sofrata A, Santangelo EM, Azeem M, Borg-Karlson AK, Gustafsson A, Pütsep K. Sullivan D, Coleman D., Candida dubliniensis: characteristics and identification .J Clin Microbiol.1998 ; 36 : 329-34.

Teuscher E., Anton R. et Lobstein A. Plantes aromatiques: épices, aromates, condiments.2005 : 45p

Thompson DS, Carlisle PL, Kadosh D., Coevolution of morphology and virulence in Candida species. Eucaryotes Cell.2011;10(9):1173-82.

Wagner H. Pharmazeutse she biologie. Drogen inhaltesstoffe. Gustave fisher verfag Sturtaag New yorc. 1993:522.

Yarbrough JM, Rake JB, Eagon RG. Bacterial inhibition of nitrate, inhibition of active transport, but not of group translocation and of intercellular enzymes. Appl Environ Microbiol 1980; 39: 831- 834.

Zrihi GN, Kra AKM, Etien DT. Étude botanique et évaluation des activités antifongiques de Mitracarpus villosus (MV) (Rubiaceae) et Spermacoe verticillata (SV) Rubiaceae) sur la croissance in vitro de Aspergillus fumigatus. Revue Méd. Pharm. Afr. 2007;20: 9-17.

Annexes :

Annexes :

Composition chimique des milieux utilisés :

- **Muller Hinton agar**

Infusion de viande de bœuf déshydraté.....	300g
Hydrolysate de caséine	17.5g
Amidon de maïs.....	5g
Agar Agar	13g
Eau distillée.....	
1000ml	

- **Gélose nutritive :**(bouillon nutritif solidifié par addition d'agar- agar).

Macération de viande (eau distillée + extrait de viande q.s.)	
Peptonetrypsique.....	15 g
NaCl ou KCl	5 g
Agar.....	15à20 g
PH final 7,2 – 7,4 1 litre	15 g 5 g 15à20 g
Stériliser à 115 °C pendant 20 min.	

- **Bouillon nutritif :**

Macération de viande (eau distillée + extrait de viande q.s.)	1L
Peptonetrypsique.....	15 g
NaCl ou KC	5 g
pH final	7,2 – 7,4
Stériliser à 115 °C pendant 20 min.	



Ethanol

- **Solvant utilisé :** _____