

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique



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



MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

KHEDROUGUI Zahera & BOUHELLA Hanane

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité : Microbiologie Appliquée

THÈME

**Évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles
essentielles de *Artemisia herba alba* de la région de
El-Bayadh sur quelques germes pathogènes**

Soutenue publiquement le 18/09/2022

DEVANT LE JURY

Président	M. DJIBAOUI Rachid	Pr	U. Mostaganem
Encadreur	M. ARABI Abed	MCB	U. Mostaganem
Examineur	Mme. BENOURED Fouzia	MCA	U. Mostaganem

Année universitaire 2021-2022

Remerciements

Nous remercions « **Dieu** » de nous avoir donné le courage, les connaissances Et la volonté de terminer cette formation malgré ses dangers.

Nous exprimons nos sincères remerciements aux membres de jury : **Monsieur DJIBAOUI Rachid** Professeur à l'Université de Mostaganem. **Mme BENOURED Fouzia** Maître de conférence à l'Université de Mostaganem. Qu'ils ont accepté la lourde tâche de lire l'intégralité de ce manuscrit et de participer au jury de notre soutenance.

Nous remercions particulièrement notre encadreur l'enseignant **Dr. ARABI Abed** pour son suivi et l'intérêt qu'il nous a apporté tout au long de ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de notre profonde gratitude pour ses précieux conseils et ses encouragements.

Nous adressons nos sincères salutations aux enseignants du Universitaire Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem et tous ses personnels de la faculté des sciences de la nature et de la vie qui ont fait Preuve de patience, de soutien et d'encouragement

Nous ne saurions assez exprimer notre reconnaissance à **Mme. Lezrag Hafida** responsable du laboratoire de microbiologie n°1. Nous tenons à lui exprimer notre sincère gratitude pour la compétence, la patience et le soutien moral continu qu'elle nous a apportés dans la réalisation de ce mémoire. Ainsi que tous les personnels du laboratoire « d'hygiene de Mostaganem », en Particulier **Mme Haddou Laila** pour ses informations et son soutien.

Enfin, Nous tenons à exprimer notre sincère gratitude à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce travail:

A ma chère mère et à mon cher père qui n'ont jamais cessé de me supporter, me soutenir et m'encourager durant mes années d'études. Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde gratitude et Teconnaissance.

A mes frères, mes sœurs et qui me donnent de l'amour et de la vivacité.

A tous mes amis qui m'ont toujours encouragé, et à qui je souhaite plus de succès.

Merci !

Hanane Bouhella



Dédicace

Je dédie ce travail à :

À mon père KHEDROUGUI Ahmed et ma mère, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études.

À my snake Imène CHIKH, j'ai toujours pu compter sur vous quel que soit le moment.

À mes sœurs, Hanane, Manel et mon frère Abdelhalim merci pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral. Restons unis et soyons fidèles aux espérances de nos parents.



KHEDROUGUI Zahera

Table des Matières

Résumé	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Introduction	1

Partie Bibliographique

Chapitre I. Les plantes médicinales et aromatiques

I.1. Généralités	3
I.2. Histoire des plantes médicinales et aromatiques	3
I.3. La phytothérapie	4
I.3.1. Définition	4
I.3.2. Bienfaits de la phytothérapie	4
I.3.3. Classification des plantes médicinales et aromatiques	4
I.3.4. Composition chimique des plantes médicinales	5
I.4. Les huiles essentielles	6
I.4.1. Définition	6
I.4.2. Historique	6
I.4.3. Caractéristiques et propriétés physicochimiques	7
I.4.4. Localisation et rôle dans la plante	7
I.4.5. Activités biologiques	8
I.4.6. Composition chimique	8
I.4.7. Méthodes d'extraction	8
I.4.7.1. Extraction par hydrodistillation	9
I.4.7.2. Extraction par entraînement à la vapeur	9
I.4.7.3. Extraction par expression à froid	10
I.4.7.4. Extraction par solvants organiques	11
I.4.7.5. Extraction assistée par micro-ondes	11
I.4.7.6. Extraction par fluide à l'état supercritique	12
I.4.8. Utilisation des huiles essentielles	13
I.4.9. Toxicité des huiles essentielles	14

Chapitre II. Présentation de la plante *Artemisia herba alba*

II.1. Définition	15
II.2. Classification (systématique).....	15
II.3. Origine et répartition géographique.....	16
II.4. Description botanique	16
II.5. Écologie	16
II.6. Biologie	17
II.7. Composition chimique.....	17
II.8. Les huiles essentielles d' <i>Artemisia herba alba</i>	18
II.9. Intérêt de la plante	20
II.9.1. En phytothérapie	21
II.9.2. En alimentation	21
II.9.3. En pastoralisme	21
II.9.4. Domaine cosmétique.....	21
II.10. Toxicités	21

Chapitre III. Antibiorésistance

III.1. Généralités.....	22
III.2. Antibiotique.....	23
III.2.1. Définitions.....	23
III.2.2. Mécanisme d'action des antibiotiques.....	23
III.2.3. Résistance aux antibiotiques	24
III.2.3.1. Résistance naturelle.....	24
III.2.3.2. Résistance acquise.....	24
III.2.4. Développement de la résistance aux antibiotiques.....	27
III.2.5. Mécanisme de résistance aux antibiotiques.....	28
III.2.5.1. Inhibition enzymatique des antibiotiques.....	28
III.2.5.2. Altération des cibles cellulaires des antibiotiques.....	28
III.2.5.3. Systèmes efflux bactérien.....	28
III.2.5.4. Modification de la perméabilité membranaire.....	28

Partie expérimentale

Chapitre IV. Matériel et méthodes

IV.1. Objectif du travail.....	30
IV.2. Revivification et confirmation des isolats microbiens étudiées.....	30
IV.2.1. Microorganismes de choix.....	30
IV.2.3. Origine des microorganismes	30
IV.2.4. Milieux de cultures	30
IV.2.5. Confirmation des isolats microbiens	31
IV.2.5.1. Examen macroscopique	31
IV.2.5.2. Examen microscopique	31
IV.2.5.2.1. Examen a l'état frais	31
IV.2.5.2.2. Examen après coloration de Gram.....	31
IV.2.5.3. Tests biochimiques	32
IV.2.5.3.1. Test de la catalase	32
IV.2.5.3.2. Test de l'oxydase	33
IV.2.5.3.3. Test de la coagulase.....	34
IV.2.5.4. Test de tube germinatif.....	35
IV.3. AntibioGramme / Antifongogramme (Méthode de diffusion en milieu gélosé)	36
IV.4. Étude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de <i>Artemisia herba alba longa</i>	39
IV.4.1. Matériel végétal.....	39
IV.4.2. Procédé d'extraction des huiles essentielles	39
IV.4.3. Détermination de rendement de l'extraction.....	40
IV.4.4. Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles	40
IV.4.4.1. Aromatogramme	40
IV.4.4.2. Détermination CMI (concentration minimale inhibitrice).....	43

Chapitre V. Résultats et discussion

V.1. Revivification et confirmation des isolats microbiens étudiées.....	44
V.1.1. Examen macroscopique	44
V.1.2. Examen microscopique.....	48
V.1.2.1. Examen à l'état frais	48
V.1.2.2. Coloration de Gram	49

V.1.3. Tests biochimiques	52
V.2. Antibiogramme	54
V.3. Activité antimicrobienne des huiles essentielles de <i>Artemisia herba alba</i> vis-à-vis des microorganismes testés.....	60
V.3.1. Extraction des huiles essentielles de <i>Artemisia herba alba</i>	60
V.3.2. Activité antimicrobienne des huiles essentielles de <i>Artemisia herba alba</i> face aux isolats microbiens étudiés.....	62
V.3.2.1. Aromatogramme.....	62
V.3.2.2. Détermination de la CMI des huiles essentielles de <i>Artemisia herba alba</i> vis-à-vis les isolats testés en milieu solide.....	67
Conclusion	79
Références bibliographiques	80
Annexes	87

Résumé

Le développement de la résistance aux antibiotiques chez les micro-organismes est devenu un problème majeur. C'est pour cela notre travail s'est concentré sur la valorisation d'une espèce végétale, qui pousse à l'état spontané dans les zones semi-arides de l'Algérie, à savoir, *Artemisia herba alba*, en évaluant l'activité antimicrobienne de ses huiles essentielles.

Les huiles essentielles des feuilles sèches de *Artemisia herba alba* de la région Brezina d'El-Bayadh (Algérie), ont été extraites par entraînement à la vapeur d'eau, et nous a permis d'obtenir un rendement de 0,81%.

Un groupe de microorganismes fournis par des laboratoires médicaux composé de *E. coli*, *Shigella dysenteriae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* et *Candida albicans* qui à été testé pour vérifier l'efficacité des HEs de *Artemisia herba alba*.

Un antibiogramme et un antifongigramme, sont utilisés pour sélectionner les 10 isolats les plus résistants, et qui font l'objet d'un aromatoigramme par la méthode de diffusion en milieu solide. Cette technique nous a conduits à confirmer quantitativement l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Artemisia herba alba* sur les isolats étudiés en déterminant la concentration minimale inhibitrice (CMI).

Les résultats de l'aromatoigramme et la CMI obtenus de nos expériences montrent que, les Isolats de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* sont les plus sensibles aux HEs de *Artemisia herba alba* avec des zones d'inhibition qui varient entre 16 et 19 mm de diamètre et des valeurs de CMI comprises entre 0,312 et 0,625 µl/ml. Contrairement à cette sensibilité remarquable, *E. coli*, *Shigella dysenteriae* et *Pseudomonas aeruginosa*, montrent une sensibilité un peu moins.

Mots clés : Antibiorésistance, Huiles essentielles, *Artemisia herba alba*, Activité antimicrobienne, CMI.

ملخص

أصبح تطور مقاومة الكائنات الحية الدقيقة للمضادات الحيوية مشكلة رئيسية. لهذا السبب ارتكز عملنا على تصليط الضوء على نوع نباتي، والذي ينمو تلقائياً في المناطق الشبه الجافة في الجزائر، والمعروف باسم *Artemisia herba alba*، من خلال تقييم النشاط المضاد للميكروبات باستعمال زيوتها الأساسية.

قد تم استخلاص الزيوت الأساسية للأوراق الجافة من نبات الشيح الذي اخذ من منطقة بريزينا بالبيض (الجزائر) بالتقطير ببخار الماء، والتي سمح لنا بالحصول على المرودود 0.81%.

تم اختبار مجموعة من الكائنات الحية الدقيقة التي تحصلنا عليها من مخابر التحاليل الطبية. تتكون من *E. coli* و *Shigella dysenteriae* و *Pseudomonas aeruginosa* و *Staphylococcus aureus* و *Enterococcus faecalis* و *Condida albicans* ، للتحقق من فعالية زيوت الاساسية لنبات الشيح (*Artemisia herba alba*).

استخدامنا المضادات الحيوية ومضاد الفطريات لانتقاء ١٠ عزلات مقاومة ، والتي خضعت لاختبار عطري بطريقة الانتشار في وسط صلب. قادتنا هذه التقنية إلى التأكيد الكمي على النشاط المضاد للميكروبات للزيوت الأساسية لنبات *Artemisia herba alba* على العزلات التي تمت دراستها عن طريق تحديد الحد الأدنى للتركيز المثبط (CMI).

تظهر نتائج الاختبار العطري و CMI التي تم الحصول عليها من تجاربنا أن عزلات *Staphylococcus aureus* و *Enterococcus faecalis* هي الأكثر حساسية لزيوت الاساسية مع قطر مناطق التثبيط تتراوح بين 16 و 19 مم وقيم CMI بين 0.312 و 0.625 ميكرو لتر / مل. على عكس هذه الحساسية الملحوظة، فإن *E.coli* و *Pseudomonas aeruginosa* و *Shigella dysenteriae* تظهر حساسية قليلة نوعاً ما.

الكلمات المفتاحية: مقاومة مضادات الميكروبات ، زيوت عطرية ، شيح ، نشاط مضاد للميكروبات ، الحد الأدنى للتركيز المثبط.

Abstract

The development of antibiotic resistance in micro-organisms has become a major problem. This is why our work has focused on the valorization of a plant species growing in spontaneous state in the semi-arid zones of Algeria, named *Artemisia herba alba*, by evaluating the antimicrobial activity of their essential oils. The essential oils of the dry leaves of *Artemisia herba alba* from Brezina region of El-bayadh (Algeria), were extracted by steam distillation which allowed us to obtain a yield of .081%.

A group of microorganisms provided by medical laboratories consisting of *E. coli*, *Shigella dysenteriae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*, was tested to verify the effectiveness of *Artemisia herba alba* essential oils.

An antibiogram and an antifungigram were used to select 10 most resistant isolates, which are the subject of an aromagram by the method of diffusion in a solid medium.

This technique led us to quantitatively confirm the antimicrobial activity of the essential oils of *Artemisia herba alba* on the 10 isolates studied by determining the minimum inhibitory concentration (MIC).

The results of the aromagram and the MIC obtained from our experiments show that isolates of *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* are the most sensitive to essential oils of *Artemisia herba alba* with inhibition zones varying between 16 and 19 mm in diameter and values MIC between 0.312 and 0.625 µl/ml.

Keywords : Antimicrobial resistance, Essential oils, *Artemisia herba alba*, Antimicrobial activity, MIC.

Liste des abréviations

λ : Lambda

°C : Degré Celsius

A. : *Artémisia*

ADN : Acide désoxyribonucléique

BCP: bromocrésol-pourpre

cm : Centimètre

CMI : Concentration minimale inhibitrice

DMSO : Diméthylsulfoxyde

E. : *Escherichia*

fig : Figure

h : Heure

HE_s : Huiles essentielles

I : Isolat

JC : Jésus-Christ

kg : Kilogramme

L. : Linné

LPS : Lipopolysaccharide

MBLs : Métallo- β -lactamases

mg : Milligramme

MH : Mueller-Hinton

ml : Millilitre

mm : Millimètre

n° : Numéro

\emptyset : Diamètre

pH : Potentiel d'hydrogène

R : Rendement

s : seconde

S : Sensible

S. : *Staphylococcus*

sp : Species

spp : species plurimae

T.S : Très sensible.

UFC : Unité formant colonie

v : Volume

α : Alpha

β : Béta

Liste des tableaux

Numéro	Titre	Page
Tableau n° 01.	Systématique de <i>Artemisia herba alba</i> Asso	16
Tableau n° 02.	Composés majoritaires retrouvés dans les chémotypes des huiles essentielles de <i>Artemisia herba alba</i>	19
Tableau n° 03.	Différents milieux de culture utilisés pour cette expérimentation	31
Tableau n° 04.	Liste des antibiotiques testés sur les isolats	37
Tableau n° 05.	Mobilité des espèces microbiennes étudiées.	49
Tableau n° 06.	Résultats de la coloration de Gram des espèces étudiées.	49
Tableau n° 07.	Résultats des tests de type respiratoire des tests biochimiques	52
Tableau n° 08.	Résultats de l'antibiogramme de <i>E. coli</i> .	54
Tableau n° 09.	Résultats de l'antibiogramme de <i>Shigella dysenteriae</i> .	55
Tableau n° 10.	Résultats de l'antibiogramme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	55
Tableau n° 11.	Résultats de l'antibiogramme de <i>Staphylococcus aureus</i> .	56
Tableau n° 12.	Résultats de l'antibiogramme de <i>Enterococcus faecalis</i> .	56
Tableau n° 13.	Résultats de l'antibiogramme de <i>Candida albicans</i> .	57
Tableau n° 14.	Rendement d'extraction des huiles essentielles de <i>Artemisia herba alba</i> par entraînement à la vapeur d'eau.	61
Tableau n° 15.	Résultats de l'aromatogramme des huiles essentielles de <i>Artemisia herba alba</i> sur les souches microbiennes étudiées.	63
Tableau n° 16.	Résultats de la CMI des huiles essentielles de <i>Artemisia herba alba</i> vis-à-vis les souches microbiennes étudiées.	67

Liste des figures

Numéro	Titre	Page
Figure n° 01.	Montage d'hydrodistillation sur un appareil de Clevenger modifié	9
Figure n° 02.	Méthode d'extraction par entrainement à la vapeur d'eau	10
Figure n° 03.	Photos à gauche d'une Pelatrice et à droite d'une centrifugeuse séparatrice d'essence de citrus des eaux résiduelles	11
Figure n° 04.	Méthode d'extraction des huiles essentielle assisté par microondes	12
Figure n° 05.	Méthode d'extraction des huiles essentielle par le CO ₂ supercritique	13
Figure n° 06.	<i>Artemisia herba alba</i>	15
Figure n° 07.	Augmentation des décès dus à la résistance aux antibiotiques par rapport autres décès et ce qu'elle sera en 2050	22
Figure n° 08.	Modes d'action des antibiotiques dans la cellule bactérienne	24
Figure n° 09.	Mode d'acquisition de résistance par le transfert génétique	26
Figure n° 10.	Evolution de la fabrication d'antibiotique correspondant au développement de la résistance bactérienne à celui-ci au fil des années	27
Figure n° 11.	Principaux mécanismes bactériens de résistance aux antibiotiques	29
Figure n° 12.	Technique de coloration de Gram	32
Figure n° 13.	Schéma présenté la technique de teste de la catalase	33
Figure n° 14.	Schéma présenté la technique de test d'oxydase	33
Figure n° 15.	Technique du test de la coagulase	34
Figure n° 16.	Test en tube Germinatif	35
Figure n° 17.	Technique d'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé	38
Figure n° 18.	Cartographie de la zone d'échantillonnage	39
Figure n° 19.	Dispositif d'extraction des huiles essentielles par entrainement à la vapeur d'eau.	40
Figure n° 20.	Technique d'aromatogramme par diffusion en milieu gélosé	42
Figure n° 21.	Méthode de la détermination de la CMI.	43
Figure n° 22.	Aspect macroscopique de <i>Escherichia coli</i> sur milieu BCP.	46
Figure n° 23.	Aspect macroscopique de <i>Shigella dysenteriae</i> sur milieu Hektoen.	46
Figure n° 24.	Aspect macroscopique de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sur milieu King A	47
Figure n° 25.	Aspect macroscopique de <i>Staphylococcus aureus</i> sur milieu Chapman.	47
Figure n° 26.	Aspect macroscopique de <i>Candida albicans</i> sur milieu Sabouraud.	48
Figure n° 27.	Aspect microscopique de <i>Escherichia coli</i> après coloration de Gram	50
Figure n° 28.	Aspect microscopique de <i>Shigella dysenteriae</i> après coloration de Gram	50
Figure n° 29.	Aspect microscopique de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> après coloration de Gram	50
Figure n° 30.	Aspect microscopique de <i>Staphylococcus aureus</i> après coloration de Gram	50
Figure n° 31.	Aspect microscopique de <i>Enterococcus dysenteriae</i> après coloration de Gram	50
Figure n° 32.	Observation microscopique de <i>Candida albicans</i> après coloration au bleu de méthylène.	51

Figure n° 33.	Aspect microscopique de du tube germinative chez <i>Candida albicans</i>	51
Figure n° 34.	Résultat du test de la catalase chez (<i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>S. aureus</i> <i>et Shegilla dysenteriae</i>)	53
Figure n° 35.	Résultat du test de l'oxydase chez (<i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>S. aureus</i> <i>et Shegilla dysenteriae</i>).	53
Figure n° 36.	Résultat du test de la coagulase chez <i>S. aureus</i>	53
Figure n° 37.	Aantibiogramme de <i>E. coli</i> .	57
Figure n° 38.	Aantibiogramme de <i>Shegilla dysenteriae</i> .	58
Figure n° 39.	Aantibiogramme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	58
Figure n° 40.	Aantibiogramme de <i>Staphylococcus aureus</i> .	59
Figure n° 41.	Aantibiogramme de <i>Enterococcus faecalis</i> .	59
Figure n° 42.	Aantibiogramme de <i>Candida albicans</i> .	60
Figure n° 43.	Extraction des huiles essentielles de <i>Artemisia herba alba</i> par entraînement à la vapeur d'eau.	61
Figure n° 44.	Diamètres des zones d'inhibition des huiles essentielles de <i>Artemisia herba alba</i> vis-à-vis les germes testés	63
Figure n° 45.	Aromatogramme de <i>E. coli</i> par l'huile essentielle de <i>Artemisia herba alba</i> .	64
Figure n° 46.	Aromatogramme de <i>Shegilla dysenteriae</i> par l'huile essentielle de <i>Artemisia herba alba</i> .	64
Figure n° 47.	Aromatogramme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> par les huiles essentiels de <i>Artemisia herba alba</i> .	65
Figure n° 48.	Aromatogramme de <i>Staphylococcus aureus</i> par l'huile essentielle de <i>Artemisia herba alba</i> .	65
Figure n° 49.	Aromatogramme de <i>Enterococcus faecalis</i> par l'huile essentielle de <i>Artemisia herba alba</i> .	66
Figure n° 50.	Evaluation de la CMI des HEs de <i>Artemisia herba alba</i> en µl/ml (v/v).	68
Figure n° 51.	Concentration minimale inhibitrice des huiles essentielles de <i>Artemisia herba alba</i> . Vis-à-vis <i>E. coli</i> .	69
Figure n° 52.	Concentration minimale inhibitrice des huiles essentielles de <i>Artemisia herba alba</i> . Vis-à-vis <i>S. aureus</i> .	69

Introduction

Introduction

C'est la nature qui s'est toujours avérée être le refuge de l'homme et son sauveur de nombreuses maladies pendant une longue période, mais les progrès et le développement qui leur sont arrivés l'ont incité à abandonner leurs composants médicinaux et à se laisser guidés par les médicaments (Allama et Rizk, 2016).

Alexandre Fleming, le découvreur des antibiotiques, a prédit en recevant le prix Nobel de médecine en 1945, en disant : Il n'est pas difficile de rendre les bactéries résistantes à la pénicilline si elles sont exposées à des concentrations insuffisantes de celle-ci (Kishk, 2017).

Aujourd'hui, le problème de notre incapacité à traiter les infections courantes est une menace mondiale.

Alors l'homme est retourné à la nature pour réparer ce que les médicaments chimiques avaient fait, et a commencé à chercher des alternatives qui seraient bénéfiques, il a commencé à rechercher de plus en plus la plante et a découvert presque tous ses composants notamment les huiles essentielles.

L'aromathérapie ou l'utilisation des huiles essentielles à des fins thérapeutiques est en expansion. Elle s'affirme comme une thérapeutique complémentaire dans le conseil officinal (Mayer, 2012).

Artemisia herba alba (Armoise blanche) est une espèce de la famille des *Asteraceae*. Elle est très répandue sur les hauts plateaux dans l'étage bioclimatique semi-aride frais (Afrique du Nord). Elle est utilisée dans la médecine traditionnelle pour faciliter la digestion, calmer les douleurs abdominales et celles du foie, dans le traitement du diabète et comme vermifuge (Houmani *et al.*, 2004). Surtout que les huiles essentielles ont une structure chimique très complexe. Ceci explique son efficacité antimicrobienne ; et l'inadaptation des bactéries dans le milieu contenant les huiles essentielles (Bouhouia *et al.*, 2020).

Notre travail est réparti en deux parties :

- La première partie se scinde en trois chapitres, le premier traite l'étude bibliographique sur les plantes médicinales et aromatiques ; Huiles essentielles, extraction et domaines d'utilisations, le deuxième axe sur des généralités sur *Aremisia herba alba* et les activités biologiques des HEs ; description, composition et utilisation, et le dernier aborde l'antibiorésistance.
- La deuxième partie se devise en deux chapitres, le premier comporte le matériel et méthodes utilisés ; matériel biologique, méthodologie de travail et l'extraction des huiles essentielles de *Aremisia herba alba*, et le second chapitre centré sur les résultats obtenus et leurs discussions.

Partie bibliographique

I.1. Généralités

Les plantes médicinales et aromatiques sont parmi les plus anciens groupes des plantes connues et utilisées par l'homme à travers les âges pour des nombreuses fins (alimentation, traitement...).

Les herbes sont des plantes à croissance limitée (ils ne peuvent pas atteindre la hauteur d'un arbre). La plupart des herbes médicinales sont des plantes saisonnières contenant des substances actives avec différentes concentrations qui ont un effet chimique ou physiologique sur le corps humain **(Issa, 2012)**.

Ces substances ont la capacité de traiter une maladie spécifique ou de réduire ses symptômes, c'est pour cela que ces plantes sont utilisées comme une matière première de base dans l'industrie pharmaceutique moderne **(Omran et Kamal, 2019)**.

Les plantes aromatiques sont celles qui contiennent des huiles essentielles dont la nature diffère d'une plante à une autre selon l'environnement et la nature physiologique de la plante **(Baby et Samuel, 2007)**.

Le changement du climat (doux, chaud ou froid) fait répartir ces plantes selon leurs capacités d'adaptation et leur nature physiologique. Par exemple les plantes qui se trouvent dans le désert, telle que l'absinthe et le sidère sont distingués par leur capacité à tolérer la chaleur et la sécheresse, elles diffèrent des plantes qui vivent dans un environnement tempéré comme la lavande et la camomille **(Gad, 2011)**.

I.2. Histoire des plantes médicinales et aromatiques

Les plantes médicinales et aromatiques sont généralement utilisées pour le traitement des maladies. Des manuscrits de la civilisation ancienne particulièrement la civilisation égyptienne (3000 JC) ont été trouvés dans les tombes des pharaons où de nombreuses plantes médicinales et aromatiques sont citées et utilisées dans leurs vies quotidiennes ainsi que le manuscrit ibère écrit sur de rouleaux de papyrus est l'un des plus anciens contient d'innombrables plantes médicinales.

La civilisation babylonienne et la civilisation assyrienne ont aussi accordées une grande attention aux plantes médicinales utilisées par les anciens chinois (4700 av JC), plus de 250 espèces végétales de grandes valeurs thérapeutiques étaient décrites par les herboristes chinois.

Même les grecs et les arabes musulmans ont réussie à trouver des mélanges naturels performants utilisées jusqu'à maintenant (**Abboud et Waheed, 2017**).

I.3. La phytothérapie

I.3.1. Définition

La médecine traditionnelle ou phytothérapie est considérée comme la mère de la médecine naturelle, à laquelle l'homme a eu recours depuis l'antiquité et en découvrant au fur et à mesure l'effet des plantes et des herbes sur la santé humaine (**Ibrahim, 2002**).

Les pratiques médicales traditionnelles héritées de génération en génération et transmises par les ancêtres sont acquies une grande popularité dans le temps présent, la phytothérapie est devenue préférée par le peuple algérien. L'utilisation de cette dernière est plus courante chez les villageois qui ont fait preuve d'une grande compétence médicinale en guérissant les maladies avec des traitements à base de plantes notamment celles des zones montagneuses. **Hilton Sampson (1903-1907)** a vécu en Algérie pendant quatre ans et a coexisté avec des habitantes des campagnes et des montagnes, des médecins et des gens ordinaires a déclaré : « La profession médicale en Algérie est héritée de père en fils et ils ont de précieux livres sur la médecine, dont les origines remontent aux médecins arabes médiévaux » (**Naftti, 2019**).

I.3.2. Bienfaits de la phytothérapie

La phytothérapie a de nombreux avantages, dont certains sont :

- La capacité de l'intégrer dans notre alimentation quotidienne ;
- Le traitement de nombreux problèmes de santé se fait sans aucune intervention chirurgicale, tels que les maladies du foie, le diabète et les troubles digestifs ;
- La phytothérapie est moins chère que le traitement conventionnel vu que les plantes médicinales sont généralement à la portée des habitants.

I.3.3. Classification des plantes médicinales et aromatiques

Les plantes médicinales et aromatiques peuvent être classées selon plusieurs critères (morphologie, physiologie, thérapie ...etc.).

On note notamment la classification morphologique qui se fait selon la partie utilisée contenant la substance active (**Malas, 2020**).

- **Les plantes entièrement utilisées (au niveau de la plante entière)** : Dans ce type de plantes les produits chimiques actifs sont distribués dans toutes les parties de la plante sans avoir tendance de se concentrer dans un agame particulier comme le Datura et l’Absinthe.
- **Au niveau des feuilles** : Les substances actives sont concentrées dans les feuilles seulement, telle que la Menthe, l’Aloie Vera et le Henné.
- **Au niveau des fleurs** : Ce sont des plantes dont les produits chimiques sont actifs dans leurs fleurs, comme la Camomille, le Jasmin et le Safran.
- **Au niveau des fruits** : Ce sont des plantes qui contiennent des substances actives dans leurs fruits comme les piments forts.
- **Au niveau des graines** : Les principes actifs sont trouvés dans les graines comme la Nigelle, le Ricin et le Tournesol.
- **Au niveau des parties terrestres (rhizomes et racines)** : Ces plantes sont caractérisées par la présence des substances actives au niveau de leurs tiges, racines comme les Réglisses.

I.3.4. Composition chimique des plantes médicinales

Bien que les plantes médicinales soient bénéfiques mais cela n’annule pas la possibilité d’existence des plantes nocives. L’effet des plantes sur l’humain dépend de leur composition chimique, la concentration des principes actifs et l’environnement dans lequel elles poussent. Il existe deux composantes médicinales importantes dans les plantes (**Issa, 2012**).

- **Les huiles essentielles (volatile)** : Ceux sont des composés chimiques organiques très concentrés et sont principalement responsables de l’odeur distinctive de la plante, ces composés ont la capacité de s’évaporer et de se volatiliser à des températures normales. Ils sont caractérisés par la non transportation dans les molécules du corps gras, et il est facile de les séparer des parties des plantes qui les portent, ils n’ont aucune sensibilité au rancissement lorsqu’ils sont exposés à la lumière directe et à l’air.

• **Les Tanins** : Ce sont des composés polyphénoliques sans azote, ils se présentent en fortes concentration dans les plantes nues telles que le Cyprès et le Pin. Ces substances se trouvent dans l'écorce, les tiges, les feuilles et les fruits des plantes.

I.4. Les huiles essentielles

I.4.1. Définition

Le parfum des plantes aromatiques, également appelé "essence" ou "huile volatile", a une composition complexe et possède un arôme distinctif. La norme AFNOR NF T 75-006 du 5 Février 1998 donne la définition suivante d'une huile essentielle : « Une matière première végétale est extraite soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques des écorces d'agrumes, soit par distillation sèche ». Après cela, l'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques. Les traitements physiques n'entraînant pas de modification significative de sa composition (**Bruneton, 2008**).

I.4.2. Historique

Il y a des milliers d'années, les égyptiens utilisaient les huiles essentiels comme parfum pour embaumer les cadavres. Au XVI^e siècle, grâce aux travaux sur les huiles essentielles de romarin, de bois de genévrier et de lavande, la production et l'utilisation des huiles essentielles se popularisent. L'histoire des huiles essentielles (HEs) peut se résumer en :

- La période dans laquelle les plantes aromatiques étaient brûlées ou mises à infuser ou à macérer dans une huile végétale. A cette époque, intervient la notion d'activité liée à la substance odorante,
- La deuxième correspond à la recherche de l'extraction de cette substance odorante. Apparaît alors le concept d'huile essentielle qui aboutit à la création et au développement de la distillation,
- Enfin, la dernière qui est la période moderne dans laquelle la connaissance des composants des huiles essentielles intervient et explique les effets physico-chimiques, biochimiques, physiologiques, voire électroniques des arômes végétaux.

Donc, la valeur des plantes est de plus en plus prouvée scientifiquement ; c'est ce qui constitue d'ailleurs un argument de taille pour leur usage en médecine (**Chouitah, 2012**).

I.4.3. Caractéristiques et propriétés physicochimiques

Les huiles essentielles ont des propriétés physicochimiques spécifiques qui leur distinguent des huiles végétales et d'autres types des huiles, nous citons parmi eux :

- L'état liquide à température normale ;
- Les huiles essentielles ont un parfum aromatique fort et clair ;
- Généralement incolore ou jaune à l'exception de certaines huiles essentielles (**Zaibet, 2016**).
- Insoluble dans l'eau mais soluble dans les solvants organiques usuels : les huiles grasses, les alcools de haute qualité et l'éther ;
- Leur densité est inférieure à celle de l'eau ;
- Elles contiennent des substances volatiles, ce qui les différencie des huiles "stables" ;
- Toutes les huiles volatiles sont piquantes, hautement inflammables ;
- Très sensible à l'oxydation et a également tendance à polymériser pour former des produits résineux
- Ils perdent rapidement leurs propriétés lorsqu'ils sont exposés à la chaleur ou même à la lumière (**Bardeau, 2009**).
- Le point d'ébullition est compris entre 60°C et 240°C ;
- Les huiles essentielles sont des mélanges très complexes appartenant à deux groupes caractérisés par des origines biologiques différentes : le groupe des terpénoïdes d'une part et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane d'autre part (**Bouzouita et al., 2008**).

I.4.4. Localisation et rôle dans la plante

Toutes les plantes ont la capacité de produire des composés volatils, mais le plus souvent seulement en petites quantités. Seulement 10% des plantes sont "aromatiques". La capacité d'agrégation des HEs est la propriété de certaines familles de plantes réparties dans l'ensemble du règne végétale. Il est également représenté par la classe des Cupressaceae (Cèdre) et des pins (pin et sapin) comme la classe des Angiospermes. Les familles les plus importantes sont les

dioètes comme les Apiacées (coriandre), Asteracea (Camomille), Geraniaceae (Géranium), Illiciaceae (Anis), Lamiaceae (Menthe), Lauraceae (Cannelle), Myristicaceae (Noyer), Myrtaceae (Eucalyptus), Oleacea (Jasmin), Rosacea (Rose), Rutacée Santal (Bois de Santal Citron). Les monocotylédones sont représentées principalement par les familles Poacea (vétiver) et Zingiberaceae (gingembre). Ce sont des sécrétions naturelles produites par la plante et retrouvées dans les cellules ou parties de la plante telles que celles des fleurs (rose), des sommités fleuries (lavande), des feuilles (citron), de l'écorce (cannelle), des racines (iris), des fruits (vanille), bulbes (ail), racines (gingembre) ou graines (noix de muscade) **(Bruneton, 2009)**.

I.4.5. Activités biologiques

En dépit de leurs antécédents d'être considérés comme des métabolites secondaires non essentiels des plantes, il est devenu clair que les huiles essentielles et leurs composants ont des fonctions biologiques spécifiques **(Mancianti et Ebani, 2020)**.

Parmi ces activités biologiques, les huiles essentielles ont montré plusieurs capacités thérapeutiques et médicinales tels que l'activité antimicrobienne, anti-inflammatoire, anticarcinogène, antioxydante, insecticide, antithrombotique et analgésique **(Bertella, 2019)**.

I.4.6. Composition chimique

Les huiles essentielles sont des composés organiques avec diverses structures chimiques et fonctions chimiques. La composition des huiles essentielles est différente dans le même sexe, Également dans le même type. Il est reconnu par deux ou trois composants principaux présents avec des concentrations quelque peu élevées (20-70%) par rapport à d'autres composants **(Bakkalia et al., 2008)**.

I.4.7. Méthodes d'extraction

Les méthodes d'extraction des huiles essentielles diffèrent les unes des autres selon leur concentration dans la plante, de sorte qu'il y a celles qui contiennent des huiles en une, deux parties ou plusieurs parties (tige, feuilles, racines, ou tous ensembles), et parmi ces méthodes nous avons :

I.4.7.1. Extraction par hydrodistillation

Dans cette technique, le ballon (fig. 1) contenant l'eau et le type de plant dont l'huile doit être extrait est bouilli jusqu'au point d'ébullition, ou les cellules végétales explosent et libèrent leurs huiles sous l'influence de la température.

Les vapeurs d'eau et d'huile essentielle montent pour atteindre un refroidisseur composé de deux tubes, l'un à travers lequel la vapeur passe et se condense pour devenir un liquide, et le seconde l'entoure contient une entrée et une sortie à travers lesquelles l'eau circule à une certaine température en continu pour refroidir.

Au final on obtient deux liquides hétérogènes, à savoir l'huile essentielle et l'eau, de sorte que l'huile reste en haut, car sa densité est inférieure à celle de l'eau, le distillat est extrait par une burette ou une pipette (Almousili, 2018).

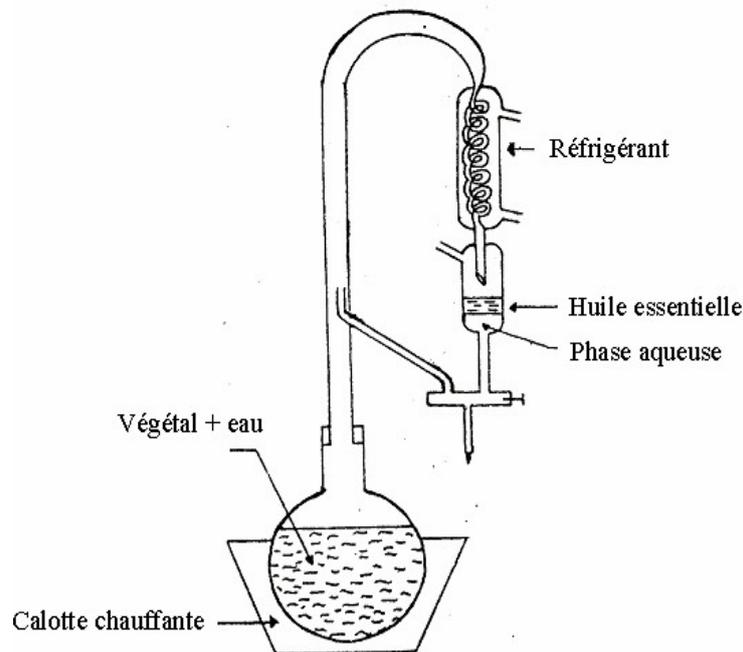


Figure n° 01. Montage d'hydrodistillation sur un appareil de Clevenger modifié (Ferhat, 2007).

I.4.7.2. Extraction par entrainement à la vapeur

Cette méthode est similaire à la méthode de distillation de l'eau, mais dans cette dernière les plantes ne sont pas placées et bouillies dans l'eau, plutôt l'eau est bouillie dans un ballon

appelé chaudière (fig. 2) pour générer de la vapeur qui traverse les plantes et pénètre pour en extraire les huiles. D'autre part, les plantes sont chauffées pour ne pas rendre la vapeur d'eau liquide, les vapeurs détruisent la structure des cellules végétales, ce qui entraîne la libération de leur huiles essentielles par l'action de la température, et parce qu'il est connu que les vapeurs sont des gaz miscible entre eux, les vapeurs d'eau et d'huile sont mélangées et transportées entre elle à travers les réfrigérant, puis elle se condensent et se récupèrent, à la fin l'huile est séparée de l'eau à l'aide d'une burette ou d'une pipette (Almousili, 2018).

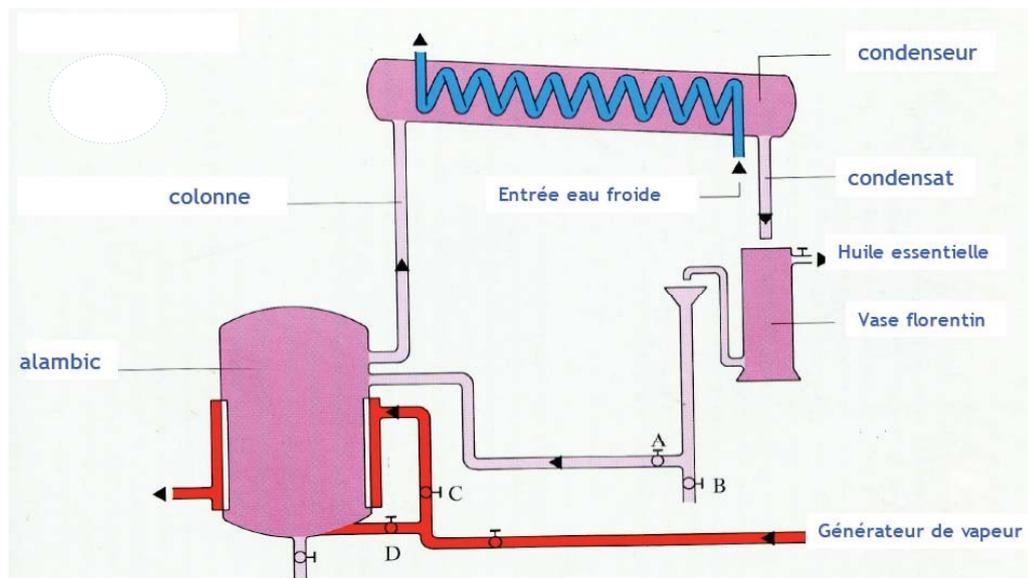


Figure n° 02. Méthode d'extraction par entraînement à la vapeur d'eau (Bousbia, 2011).

I.4.7.3. Extraction par expression à froid

Cette méthode est utilisée exclusivement pour les matières premières de la famille de Hespérides pour extraire des huiles essentielles des agrumes. Cette technique consiste à dilacérer mécaniquement l'écorce (fig. 3) du fruit pour recueillir de diverses manières les essences contenues dans les sacs oléifères (Boukatem *et al.*, 2019).



Figure n° 03. Photos à gauche d'une Pelatrice et à droite d'une centrifugeuse séparatrice d'essence de citrus des eaux résiduelles (**Bousbia, 2011**).

I.4.7.4. Extraction par solvants organiques

Il existe plusieurs solvants pour extraire les huiles essentielles des plantes et des herbes séchées (faible teneur en huiles essentielles) et différentes parties de plantes y compris les solvants chimiques qui utilisent des extraits des huiles tels que l'hexane et le benzène et avec des solvants d'autres matériaux tels que, les colorants et les cires sont également extrait. Il existe d'autres solvants utilisés dans l'extraction des huiles telles que le dioxyde de carbone actif et la méthode de saturation des graisses (**Hashemi et al., 2018**).

I.4.7.5. Extraction assistée par micro-ondes

Cette méthode est effectuée par des fours à micro-ondes (fig. 4) afin que l'extraction à l'aide de micro-ondes pénètre dans le milieu d'extraction, permettant à ce dernier d'absorber l'énergie des micro-ondes, ce qui entraîne la rupture des cellules végétales et les ingrédients actifs s'écoulent et se dissolvent dans l'extrait. Enfin, les composants actifs du produit sont prélevés par une séparation post-filtrations (**Boukhatem et al., 2019**).

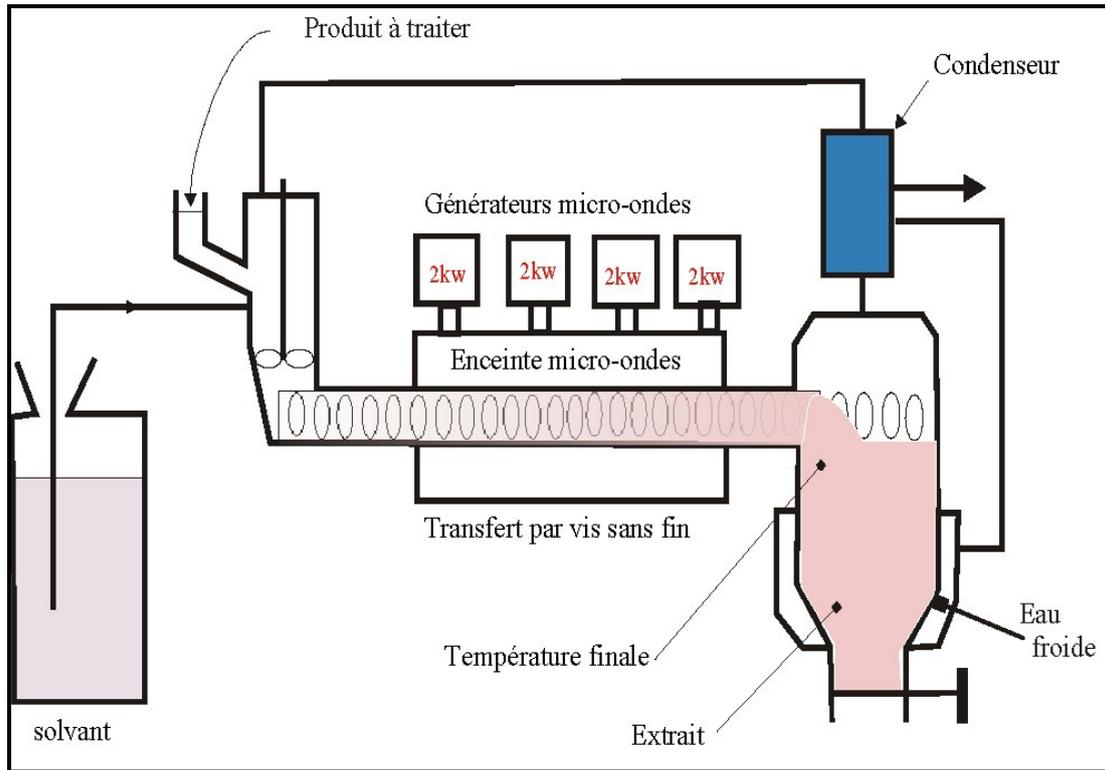


Figure n° 04. Méthode d'extraction des huiles essentielle assisté par microondes (Ferhat, 2007).

I.4.7.6. Extraction par fluide à l'état supercritique

Il s'agit d'une technique d'extraction qui utilise un liquide supercritique (fig. 5) comme solvant pour séparer certains principes actifs du solide ou du liquide, caractérisée par un taux de pureté d'extraction élevé (Boukatem *et al.*, 2019)

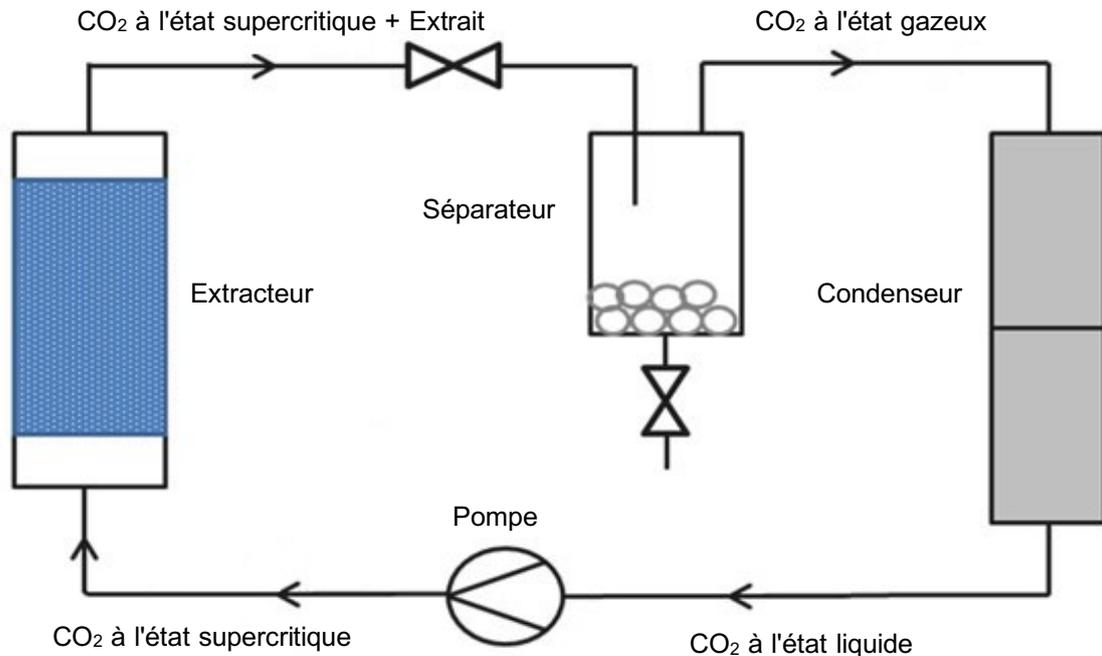


Figure n° 05. Méthode d'extraction des huiles essentielles par le CO₂ supercritique (Chenni et Elabed, 2017).

I.4.8. Utilisation des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont connues pour leurs propriétés médicinales et leur arôme et sont utilisées dans de nombreux domaines :

- **Produits pharmaceutiques :** Les huiles essentielles sont des ingrédients médicinaux vendus pour une grande variété d'applications thérapeutiques et sont des ingrédients actifs dans de nombreux médicaments en vente libre.
- **Cosmétiques et parfums :** Les huiles essentielles sont utilisées dans les cosmétiques, tels que l'industrie du parfum et du savon, et comme agent aromatisant.
- **Nourriture et boissons :** Ils sont largement utilisés dans de nombreux aliments et boissons, principalement comme agents aromatisants et conservateurs, ils sont présents dans le processus de fabrication de nombreux produits tels que les gâteaux, biscuits, soupes, sauces, chewing-gum et chocolat, bonbons (Bakkali *et al.*, 2008). Les huiles essentielles d'écorces d'agrumes

sont parmi les huiles essentielles les plus importantes, y compris les huiles d'orange, de citron, de mandarine et de pamplemousse (**Ahmed & Rehman, 2006**)

- **La médecine traditionnelle** : Les huiles essentielles sont également utilisées comme agents antimicrobiens dans la médecine traditionnelle (**Bellakhdar, 1997**) Il est appliqué comme remède antimicrobien, analgésique, sédatif, anti-inflammatoire, antispasmodique et anesthésique (**Abad et al., 2012**)

- **Autres utilisations** : Il était également utilisé pour son effet répulsif et insecticide (**Burt, 2004**). Et pour la fabrication d'adhésifs (colle, ruban adhésif, etc.), d'aliments pour animaux et dans l'industrie automobile (**Elhib, 2011**).

I.4.9. Toxicité des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des substances actives et puissantes qui provoquent des réactions cutanées en cas d'utilisation excessive. La facilité avec laquelle la peau absorbe les matières qui lui sont appliquées, surtout si elle est concentrée, ce qui augmente la possibilité d'irritations ou de cas d'eczéma, d'autre part, les huiles essentielles contiennent des composants considérés comme toxiques, car il est recommandé de les prendre avec prudence, par exemple, les cétones, qui sont un composant toxique et ne doivent pas être prises en quantité supérieure à 2% de concentration et à utiliser à l'extérieur pendant une courte période, il est également recommandé de l'éviter chez la femme enceinte car il affecte les muscles lisses de l'utérus, il a donc un effet en emménagogue et donc abortif, comme dans l'huile de sauge (**Abdoune, 2017**).

Chapitre II



Présentation de la plante *Artemisia herba alba*

II.1. Définition

Artemisia herba alba (fig. 6) (armoïse blanche ; *Chih*, الشيح en arabe, *Ifsi* ou *Zezzaré* en berbère), est un sous-arbrisseau qui se trouve habituellement dans les milieux secs et semi-arides (Ouyahya et Viano, 1988), décrite pour la première fois par le botaniste espagnol **Ignacio Jordán Claudio de Asso** en 1779 (Aidoud, 1988).



Figure n° 06. *Artemisia herba alba* (Dahmani, 2004).

II.2. Classification (systématique)

Dans le genre *Artemisia*, on compte trois espèces dans le Sahara et le steppe, *Artemisia compesiris* L., *Artemisia herba alba* Asso (tableau 1) et *Artemisia judaica*. Il existe une autre espèce de *Artemisia* qui se trouve généralement au nord du pays appelée *Artemisia arborescence* (Houamel, 2018).

Tableau n° 01. Systématique de *Artemisia herba alba* Asso (Houamel, 2018).

Embranchement	Phanérogames ou Spermaphytes
Sous-embranchement	Angiospermes
Classe	Eudicots
Sous classe	Asteridées
Ordre	Asterales
Famille	Astéracées
Genre	<i>Artemisia</i>
Espèce	<i>Artemisia herba alba</i> Asso.

II.3. Origine et répartition géographique

L'armoise blanche est une plante qui se développe dans une large gamme, elle habite les steppes boueuses et les pâturages rocheux et de terre dans les collines et le désert, les zones sèches et semi-arides telles que les hautes steppes. Ils poussent dans l'est de l'Espagne jusqu'aux plaines de l'Asie occidentale et de l'Afrique du Nord (Zaim *et al.*, 2012).

En Algérie, connue sous le nom de « Chih », couvre près de six millions d'hectares dans les steppes (Bourass, 2010). Plus d'une dizaine d'espèces ont été déterminées en Algérie. Certaines sont rares et disséminées en hautes montagnes. D'autres sont au contraire particulièrement abondantes et répandues sur de grandes étendues (Gharabi *et al.*, 2008).

II.4. Description botanique

C'est un arbre vivace de 30 à 60 cm de haut, à petites feuilles, denses, poilues, sessiles. Avec un tronc épais et des tiges ligneuses et ramifiées, Argent verdâtre et lobé d'éclats. Ça sent le thymol. Ses fleurs sont jaunes, composées chacune de 3 à 8 fleurs sur chaque tige, qui sont toutes hermaphrodites, des fruits cendrés (Ghrabi et Al-Rowaily, 2005).

II.5. Écologie

L'armoise blanche résiste à la sécheresse. son développement est lié à la nature du sol. En effet, il faut qu'il soit peu perméable, tassé et colmaté (Celles, 1980).

Elle vit dans les bioclimats allant du semi-aride jusqu'au saharien et dans les régions d'hiver chaud à frais et elle se développe dans les steppes argileuses. Dans le sud, cette plante pousse sur les sols bruns steppiques de texture moyenne et en extrême sud sur les sols sableux (Nabli, 1989).

En Algérie l'armoise blanche présente une vaste répartition géographique, et se développe dans les steppes argileuses et les sols tassés relativement peu perméables. Elle se trouve sur les dayas, les dépressions et les secteurs plus ou moins humides. Elle constitue un moyen de lutte contre l'érosion et la désertification (Ayad *et al.*, 2013).

II.6. Biologie

Ses caractéristiques morphologiques et physiologiques font d'elle une espèce bien adaptée aux conditions climatiques arides. Le dimorphisme saisonnier de son feuillage lui permet de réduire la surface transpirante et d'éviter ainsi la perte d'eau (Ferchichi *et al.*, 2004). Grâce à son système racinaire très dense à la surface, l'armoise herbe blanche est capable de valoriser toute humidité superficielle occasionnée par des petites pluies. (Le Floc'h, 1989).

Artemisia herba alba fleurit en automne, la fructification et la dissémination des graines se poursuivent jusqu'en février (Aidoud, 1988). Elle est également capable d'exploiter l'humidité du sol jusqu'à 50 cm de profondeur (Floret et Pontannier, 1982).

Lors des années pluvieuses et dans les sols qui lui conviennent, l'armoise blanche présente une forte production de graines et un pouvoir de régénération élevé (Nabli, 1989).

II.7. Composition chimique

Artemisia Herba Alba est riche en métabolites secondaires qui fournissent ses bienfaits médicaux, elle a des vertus médicinales. Parmi les métabolites, on trouve des agrégats volatils (huiles essentielles) et des composants non volatils (flavonoïdes et lactones sesquiterpéniques).

L'huile essentielle est diverse qualitativement et quantitativement, mais, Selon Mohamed *et al.* (2010) l'armoise contient des composants majeurs tels que les dérivés du camphre, l' α -Thuyone et la β -Thuyone et 1,8-cinéole et chrysanthényle. Quelques flavonoïdes

ont été identifiés comme glycosides C-flavonoïdes : l'isophitaxine (6-C-glucosylapigénine), la vicinine-2 (6,8-D-C-glucosylapigénine), le chaftoside (6-C-glucosyl-8-C-arabinosylapigénine), isoschaphtoside (6-C-arabinosyl-8-C-glucosylapigénine) (Saleh *et al.*, 1985), Flavonoïdes O-glycoside : 3-glucoside, kaempférol 3-rutinoside, quercétine, l'isorhamnétine et la patulétine (Saleh *et al.*, 1987). Plusieurs lactones sesquiterpéniques de type germacranolide et eudesmanolide ont été isolées : herbalbine, herbolides indiqués de A à J, germacrane triol et hydroxyliratrol (Ahmed *et al.*, 1990 ; Marco *et al.*, 1994 ; Boriki *et al.*, 1996). En plus de la santonine, de la coumarine et des tanins. L'armoise est un genre productif dans la recherche de nouveaux composés biologiquement actifs. Des investigations ont montré que ce genre est riche en sesquiterpène, monoterpène, flavonoïdes et coumarine (Hellal, 2011).

Les flavonoïdes détectés chez *A. herba alba* présentent une grande variation structurale, Ils vont des glycosides, flavonoïdes et flavones méthylflavonoïdes les plus courants. Dans des études sur les feuilles de *Artemisia herba alba*, Huit composés flavonoïdes O- et C-glycosides ont été isolés et identifiés (Mansour, 2015). Examen des parties aériennes de *A. herba-alba* récoltées au Liban, résultant en l'isolement de deux flavonoïdes ; Hispiduline et cercilino. Une nouvelle flavone, la 5,4'-dihydroxy-6,7,3'6,7,3'triméthoxyflavone, a été isolée de l'extrait non glycosidique des parties aériennes de *A. herba alba* (Mohammed *et al.*, 2010). Des études ont montré que dans l'huile essentielle de *A. herba alba* récoltée en Algérie, Les monoterpènes en sont les principaux composants, notamment le camphre, les dérivés de la thuyone, le 1,8-cinéole et le chrysanthényle (Dorman et Deans, 2000).

II.8. Les huiles essentielles de *Artemisia herba alba*

Les huiles essentielles ont une action protectrice en stimulant le système immunitaire contre les infections, les bactéries et les virus. C'est aussi un désinfectant. Face au développement des bactéries et au développement de leur résistance, C'est pourquoi des antibiotiques plus puissants sont produits. Cela nous pousse à nous tourner vers les huiles essentielles comme alternative. Son efficacité prouve là où certains antibiotiques ont maintenant échoué (Valent,1980).

Les travaux de recherche sur l'huile essentielle de *Artemisia herba alba* ont permis de découvrir plusieurs chémotypes (tableau 2) à travers le monde (Bertella, 2020).

Tableau n° 02. Composés majoritaires retrouvés dans les chémotypes des huiles essentielles de *Artemisia herba alba* (Bertella, 2020).

Pays/Régions	Composés majoritaires
Algérie	
- BouSaâda	• Camphre (49,3 %)
- Souk Ahrass	• Camphre (34,34 %)
- M'sila	• Camphre (19,4%)
- Oum El Bouaghi	• Chrysanthénone (16,2 %)
Tunisie	
- Tabarka	• β -thujone (23,29 %)
- Gafsa	• α -thujone (8,73 %)
- Médenine	• β -thujone (33,7 %)
	• α -thujone (21,2 %)
- Kirchaou	• β -thujone (58,4 %)
	• α -thujone (44,4%)
- Matmata	• α -thujone (17,4%)
- Samaaliat	• α -thujone (43,85 %)
- Msaken	• α -thujone (79,9 %)
- Ariana	• α -thujone (49,5 %)
- EL Kef	• 1,8 cinéole (19,59 %)
	• Chrysanthénone (64,8%)
- Kirchaou	• Camphre (49,7 %)
	• trans-sabinyl acetate (43,8 %)
	• - Davanone (20,7%)

Maroc	
- Taroudant	• α -thujone (59,07 %)
- Errachidia	• Verbénol (21,83 %)
- Oujda	• Chrysanthénone (30,6%)
- Tahanout	• Chrysanthénone (47,0 %)
- Guercif	
Plante collectée au mois d'Avril	• Chrysanthénone (47,71 %)
- Juin	• Chrysanthénone (48,45 %)
- Septembre	• Camphre (45,03 %)
- Machraa	• Chrysanthénone (52,5 %)
	• Camphre (31,9 %)
- Laayoun	• Chrysanthénone (35,3 %)
	• Camphre (43,3 %)
- Tafouralt	• Chrysanthénone (42,5 %)
	• Camphre (46,2 %)
- Sidi Chefi	• Chrysanthénone (30,6 %) ; Camphre (43 %)
- Bentayet	• Camphre (43 et 39,6 %)
- Midar	• Camphre (45,6 et 42,8 %)
- Boudnib	• α -thujone (73,8 et 44,2 %)
- Guelmina	• α -thujone (54,4 et 65,3 %)
Jordanie	
- Buseirah	• β -thujone (25,1 %) ; α -thujone (22,9 %)
	• 1,8-cinéole (20,1 %)
- Amman	• α -thujone (16,2 %)
Espagne	
- Jaén	• Davanone (18,1 %)
	• 1,8-cinéole (19,0 %)
	• 1,8-cinéole (41,8 %)
	• p-Cymène (20,6 %) ; Chrysanthénone (36,4 %)
- Aranjuez	• Cis-Chrysanthénol (27,8 %)
	• Cis-Chrysanthényl acétate (18,4 %)
	• Camphre (15,0 %)

II.9. Intérêt de la plante

D'après **Bezza (2010)**, l'Armoise blanche a une histoire thérapeutique très diversifiée et connue depuis longtemps dans la médication traditionnelle. C'est une panacée dans la médecine traditionnelle arabo-musulmane.

II.9.1. En phytothérapie

L'armoise est un médicament préconisé dans les troubles gastriques, efficace en cas de flatulences, brûlures d'estomac, constipation et pour la cicatrisation des plaies externes, surtout dans le cas de maladies du système digestif (**Abad et al., 2012**).

Les Tunisiens l'utilisent également comme remède antidiabétique, et pour les effets du foie. Une décoction de feuilles se boit à jeun suivie d'un verre d'huile (**Bouraoui, 2003**). Ses racines sont indiquées contre certains troubles nerveux (**Baba Aissa, 2000**).

II.9.2. En alimentation

L'armoise blanche a été utilisée comme aromatisant dans le thé et le café. Son utilisation dans l'industrie alimentaire est limitée en raison de la toxicité de la bêta-thuyone, qui ne doit pas dépasser 5 mg/kg (**Bendjlali et al., 1984**).

II.9.3. En pastoralisme

Pendant longtemps, *Artemisia herba alba* a été reconnue par les bergers et les nomades pour ses propriétés laxatives. Il est notamment utilisé comme vermifuge chez les ovins (**Abad et al., 2012**).

II.9.4. Domaine cosmétique

Servent à augmenter la durée de conservation des produits cosmétiques et utilisées pour leur pouvoir antiseptique et aromatique dans les parfumeries (**Beylier Manuel, 1976**).

II.10. Toxicités

L'armoise blanche est peu broutée au printemps, elle est comme légèrement toxique à cette époque. L'armoise à forte dose est abortive, La thuyone est la substance toxique et bioactive du géranium et la plus toxique est l'alpha-thuyone. Il a des effets convulsifs (**Aouadhi, 2010**). Elle est interdite aux femmes enceintes car elle est toxique à dose élevée on doit respecter les doses. Son pollen provoque des diarrhées (**Bailey et Danin, 1981**).

Chapitre III



Antibiorésistance

III.1. Généralités

Les antibiotiques ont été découverts pour la première fois par le scientifique Alexander Fleming en 1928, il a fait une révolution médicale qui a contribué à sauver des millions de personnes, mais peut-être que chaque révolution contient les germes de sa propre perte, car ce qu'on appelle la résistance aux antibiotiques a sérieusement menacé le monde, où le nombre des décès augmente (700000 personnes par ans), selon ce qu'a déclaré par président de Antibiotic Resistance Review Jim O Neil, ainsi ,la résistance est devenue l'une des causes les plus courantes des décès, et il y a une vision future (fig. 7) pour que elle atteignent 10 million de personnes par an en 2050 (Kisk, 2017).

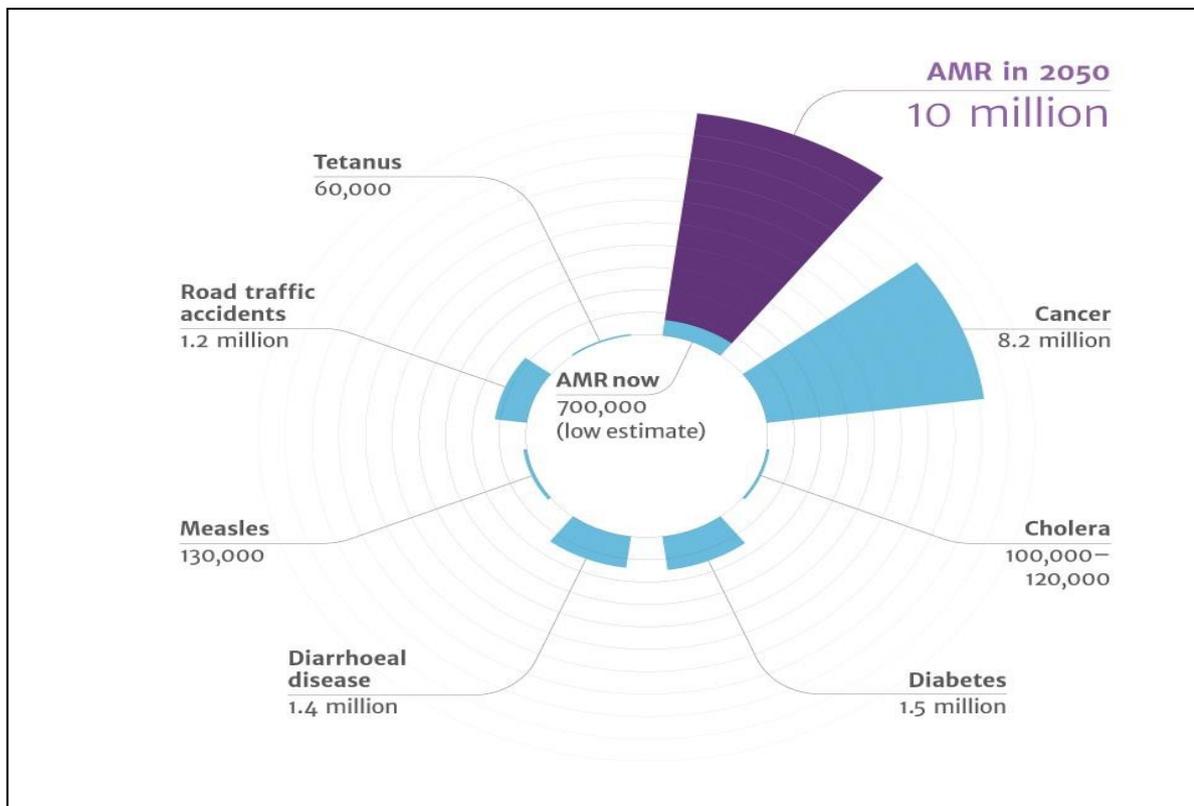


Figure n° 07. Augmentation des décès dus à la résistance aux antibiotiques par rapport autres cause de décès et ce qu'elle sera en 2050 (Dumartin, 2019).

Cette information nous amène à nous poses une série de question quels sont les antibiotiques ? Qu'est-ce que la résistance ? Et comment fonctionnent-ils ?

III.2. Antibiotiques

III.2.1. Définition

Les antibiotiques sont définis comme des composés chimiques produits par des microorganismes qui ont des effets toxiques sélectifs contre d'autres microorganismes (**Abouarqoub, 2002**), ou les antibiotiques sont des substances chimiques qui empêchent des bactéries soit inhibition de leur multiplication (activité bactériostatique), soit leur destruction (activité bactéricide) (**Nevers, 2017**).

Ils aident les défenses naturelles de l'organisme contre les bactéries et sont inefficaces contre les infections virales et certaines autres infections.

Les antibiotiques sont majoritairement représentés par des molécules d'origines naturelles et leurs dérivés, ils peuvent aussi être d'origines synthétiques ou semi-synthétiques. Les antibiotiques synthétiques sont obtenus, soit à partir de dérivés totalement artificiels, soient recréant des substances initialement extraites de microorganismes. Les antibiotiques semi synthétiques sont issues de la modification en laboratoire, de substances produites par des microorganismes (**Guinoiseau, 2010**).

III.2.2. Mécanisme d'action des antibiotiques

Il existe plusieurs mécanismes d'action de l'antibiotique (fig. 8) pour éliminer les bactéries, car ils interfèrent avec l'un de leurs aspects biologiques et arrêtent leur travail, pour mieux les antibiotiques inhibent la synthèse de la paroi cellulaire des bactéries, et c'est le mécanisme les plus courantes. Parmi ces antibiotiques nous citons : Pénicilline, Daptomycine et Fluoroquinolone.

Ils Inhibent aussi la synthèse des protéines bactériennes dans la phase de traduction, empêchant les ribosomes de fabriquer des protéines, ils agissent également pour modifier les membranes cellulaires des bactéries, ce qui entraîne la sortie de substances cellulaires importantes ou l'entrée de substance nocive dans celle-ci ils inhibent également la synthèse de l'ADN des bactéries en arrêtant ou en bloquant leurs processus de constructions cellulaires (Tétracycline, Sulfamides, Macrolides et Spectomycine) (**Taha, 2018**).

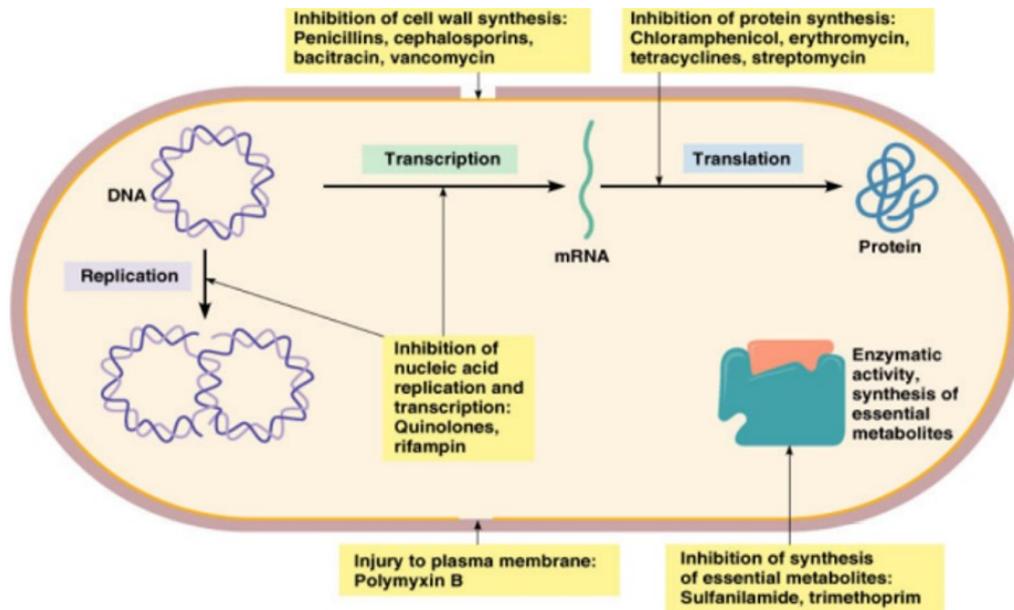


Figure n° 08. Modes d'action des antibiotiques dans la cellule bactérienne (Anuaimi, 2020).

III.2.3. Résistance aux antibiotiques

Est un changement adaptatif, ou une mutation qui se produit dans certain type de bactéries, qui leur permet de se développer et de survie en présence d'antibiotiques, qui seraient à l'origine capables d'inhiber ces bactéries pathogènes, il existe deux types de résistance :

III.2.3.1. Résistance naturelle

La résistance naturelle intrinsèque et un caractère d'espèce qui touche toutes les bactéries de l'espèce considérée, elle est stable, transmise à la descendance, mais elle n'est pas ou peu transmissible sur un mode horizontal (d'une bactérie à l'autre au sein d'une même espèce, ou entre espèces différentes). Comme par exemple *Klebsiella* spp produit naturellement de beta-lactamases, cette enzyme est alors présentée dans l'espace péri plasmatique de la bactérie et conduit à la destruction d'antibiotique comme la pénicilline A (Emaleu, 2017).

III.2.3.2. Résistance acquise

Il s'agit d'un caractère qui ne concerne alors que quelques (ou parfois de nombreuses) souches d'une espèce donnée. La résistance acquise est moins stable, mais elle se propage souvent de façon importante dans le monde bactérienne. La résistance acquise résulte d'une

modification du capital génétique de la bactérie, lui permettant de tolérer une concentration d'antibiotiques plus élevée que celle qui inhibe les souches sensibles de la même espèce (Emaleu, 2017).

Les bactéries sensibles acquièrent une résistance aux antibiotiques et cela se fait de plusieurs façons notamment :

▪ **Acquisition de résistance par le transfert génétique** (fig. 9)

- **Conjugaison** : L'ADN chromosomique, ou une partie du plasmide portant les gènes des résistances aux antibiotiques, est transmis par conjugaison entre des bactéries sensibles et autres résistantes par des ponts formés aux extrémités des quels sont appelés éperons sexuels, et le gène qui porte la résistance est appelé facteur (R-R).

-**Transformation** : Le processus de transformation se produit naturellement lorsque les bactéries prélèvent l'ADN de l'environnement environnant et acquièrent des gènes de résistance à partir de l'ADN qu'elles ont prélevé.

- **Transduction** : C'est un processus par lequel l'ADN est transféré d'une bactérie à une autre par des types spéciaux de virus qui infectent des bactéries appelées bactériophages (Almordjani, 2011).

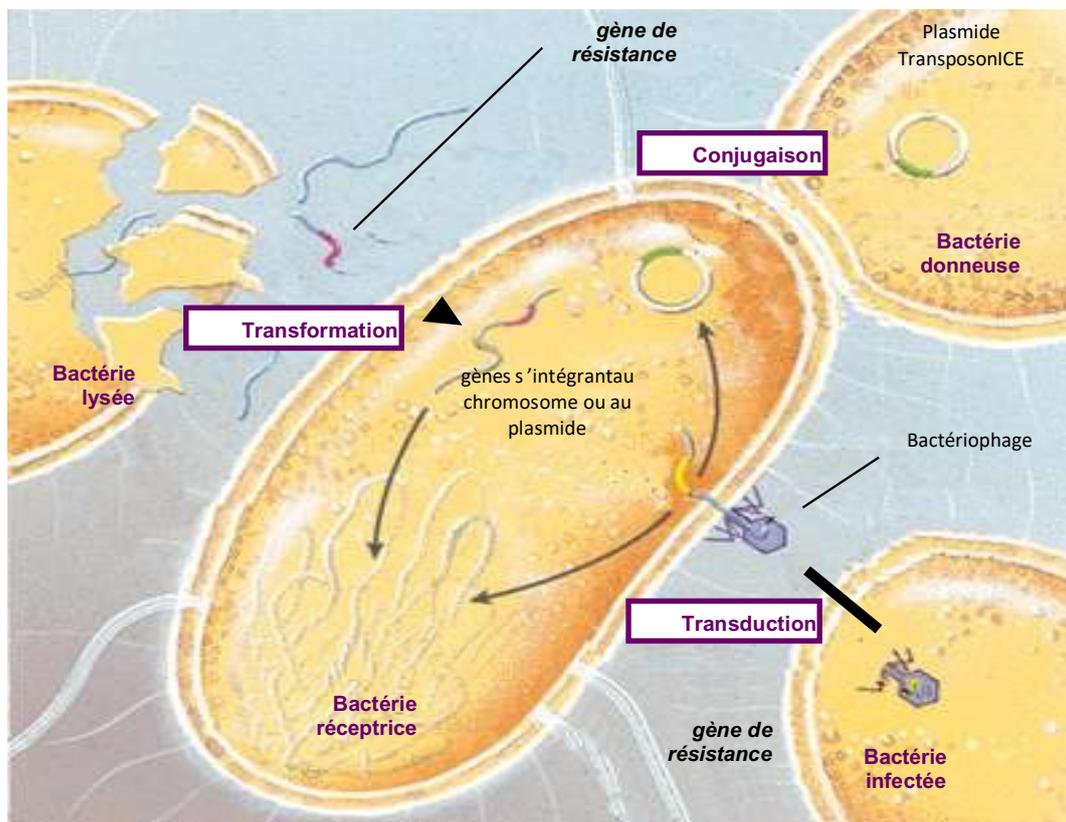


Figure n° 09. Mode d'acquisition de résistance par le transfert génétique (Doublet *et al.*, 2012).

▪ Acquisition de résistance par mutation

Des changements se produisent chez les bactéries sensibles dans leur matériel génétiques, et ils peuvent ne pas être dus aux antibiotiques, mais plutôt à d'autres facteurs tels que des facteurs physiques et chimiques, ce qui entraîne des mutations n'importe quelle. La population bactérienne qui contient un grand nombre de bactéries à une mutation génétique besoin d'une concentration plus élevée d'antibiotiques pour la tuer et donc une chance de survie et de se reproduite (Bolsos *et al.*, 2014).

▪ Multi-résistance

La résistance du germe à un antibiotique particulier le rend résistant à d'autres antibiotiques qui n'étaient pas reconnus auparavant, ceci est souvent observé avec des antibiotiques dont la composition chimique et le mécanisme d'action sont similaires. Par

exemples, la résistance des bactéries à l'un des sulfamides peut les rendre résistantes à tous les sulfamides mais ce n'est pas toujours général, il existe d'autres types de bactéries résistantes à un antibiotique et sensible à un autre, même si du même groupe, **ex** : il existe des bactéries résistantes à la Gentamicine et sensible à l'amikacine même si elles sont du même groupe chimique (Alsanafi, 2010).

III.2.4. Développement de la résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques progressivement développée au fil des années en raison de leur consommation fréquente et excessive chez l'homme et l'animal.

Ainsi, cet excès a créé, une condition appelée pression de sélection qui a permis à ces dernières d'accueillir et de propager des souches résistantes aux antibiotiques, devenus difficiles voire impossibles à traiter, et dans le schéma suivant (fig. 10) on constate que pour chaque antibiotique qui a été fabriqué au fil des années, les bactéries ont développé un facteur de résistance qui les en protège.



Figure n° 10. Evolution de la fabrication d'antibiotique correspondant au développement de la résistance bactérienne à celui-ci au fil des années (France, 2022).

III.2.5. Mécanisme de résistance aux antibiotiques

III.2.5.1. Inhibition enzymatique des antibiotiques

Certaines bactéries sont capables de résister aux antibiotiques en produisant des enzymes qui modifient ou détruisent l'antibiotique tels que :

- Enzymes qui décomposent les bêta-lactamines ;
- Enzymes inhibitrices de chloramphénicol (enzymes transforment le chloramphénicol en un composé inactif et il perd sa capacité à se lier au ribosome ;
- Enzymes inhibitrices des aminoglycosides (les résistances aux aminoglycosides est due à des mutations qui altèrent le ribosome et la barrière de perméabilité) (Almordjani, 2011).

III.2.5.2. Altération des cibles cellulaires des antibiotiques

La modification de la cible d'un antibiotique est un mécanisme commun de résistance, elle est la conséquence d'une mutation spontanée au niveau d'un gène bactérien ou l'acquisition du gène de résistance, par conjugaison, transduction ou transformation, les changements occasionnés doivent inhiber l'action des antibiotiques tout en maintenant la fonction cellulaire de la cible (Guinoiseau, 2010).

III.2.5.3. Systèmes efflux bactérien

C'est un type de résistance bactérienne qui utilise des pompes à efflux pour éliminer l'antibiotique à l'extérieur des bactéries, il confère notamment une résistance aux bêta-lactamines, aux tétracyclines et aux quinolones, il a la capacité d'expulser un large éventail de composés toxiques hors des cellules.

Ce mécanisme de résistance est particulièrement impliqué dans les résistances naturelles et acquises de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques (Almordjani, 2011).

III.2.5.4. Modification de la perméabilité membranaire

Ce mécanisme de résistance est spécifique aux bactéries à Gram négatif, car des changements se produisent dans la membrane externe qui ferme la cellule bactérienne et cette membrane contient des canaux protéiques appelés porines, ce sont des canaux qui permettent le passage sélectif de substances de poids moléculaires inférieur à 600 Daltons de l'extérieur de la cellule vers l'espace péri plasmique et vice versa (Almordjani, 2011). Il existe également

des bactéries capables de réduire la taille de leurs porines, ce qui leur permet de ne pas laisser entrer les antibiotiques, en d'autres termes, les bactéries à Gram négatif dont la membrane est constituée de Lipopolysaccharides (LPS), ce dernier constitué de trois domaines structuraux, comprenant le lipide A, qui assure son ancrage à la membrane externe, un oligosaccharide central et l'antigène O, formé de plusieurs unités oligosaccharidiques. Leurs caractères hydrophiles rendent la membrane externe des bactéries à coloration de Gram négative imperméable à la plupart des macromolécules hydrophobes. Cette particularité structurale est, en partie, responsable de la résistance intrinsèque des entérobactéries et de *Pseudomonas aeruginosa* à certains antibiotiques hydrophobes, comme les macrolides (Arabi, 2018).

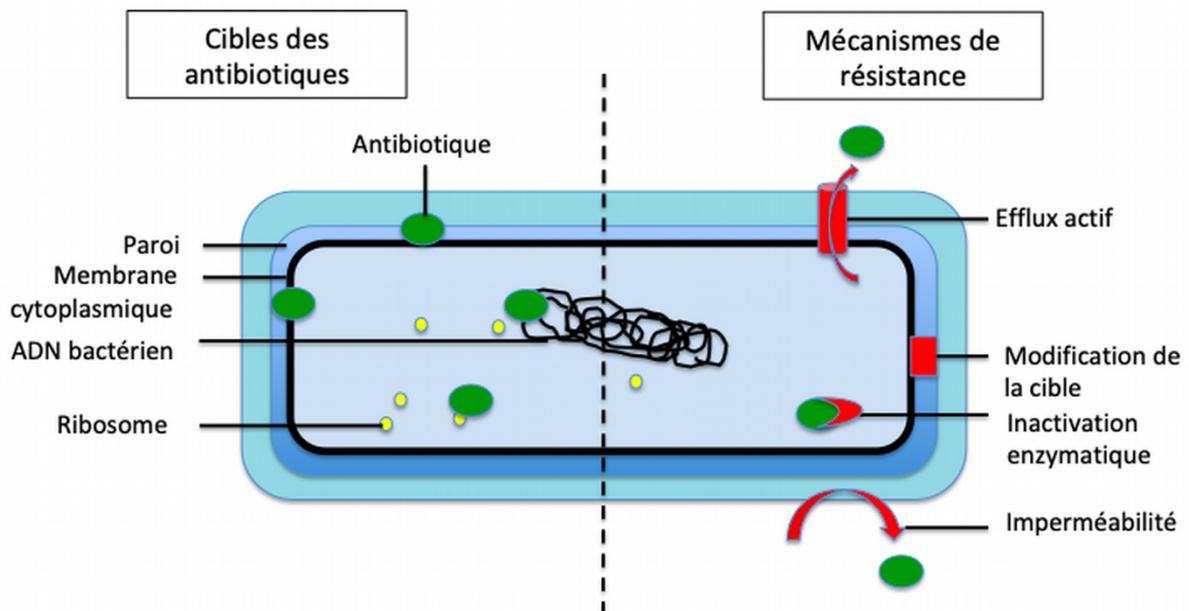
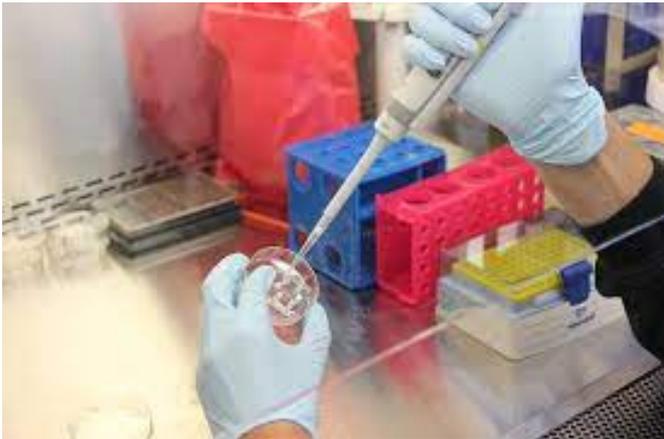


Figure n° 11. Principaux mécanismes bactériens de résistance aux antibiotiques (Emilie *et al.*, 2019).

Marie expérimentale

Chapitre IV



Matériel & Méthodes

IV.1. Objectif du travail

Les huiles essentielles sont connues pour leur pouvoir inhibiteur contre les bactéries pathogènes et multirésistantes (Tassou et Nychas. 1995).

Notre objectif était l'extraction des huiles essentielles de *Artemisia herba alba* par entraînement à la vapeur d'eau, et de tester leur effet antimicrobien sur quelques microorganismes pathogènes dans le but de confirmer l'intérêt pharmacologique et médicinale de cette plante.

IV.2. Revivification et confirmation des isolats microbiens étudiées

IV.2.1. Microorganismes de choix

Le tube digestif humain héberge environ de 10^{12} bactéries, essentiellement dans le côlon (dernier segment du gros intestin). On y dénombre plus de 450 espèces qui sont associées pour former un écosystème appelé la flore commensale intestinale. Cette flore est composée majoritairement de bactéries anaérobies ; elles représentent 99% du total de la population bactérienne.

A côté de cette flore résidente prédominante, il existe une flore transitoire variable qui s'implante dans le tube digestif en cas de pathologies. Elle contient des les genres ; *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Staphylococcus*, *Morganella*, *Enterococcus*, *Pseudomonas* et autres.

Dans ce modeste travail nous avons étudié les microorganismes suivants : Il s'agit de trois bactéries à coloration de Gram négative (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella dysenteriae*), et deux autres à coloration de Gram positive (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* sp) et une levure (*Candida albicans*).

IV.2.3. Origine des microorganismes

Les germes ont été fournis par le laboratoire d'hygiène de la Wilaya de Mostaganem et aussi du laboratoire d'analyses médicales privé.

IV.2.4. Milieux de cultures

La culture est réalisée par l'utilisation des milieux de culture suivants (tableau 3) :

Tableau n° 03. Différents milieux de culture utilisés pour cette expérimentation.

Milieu de culture	Utilisation
Gélose nutritive (annexe II)	Repiquage
Gélose BCP (annexe II)	Culture des entérobactéries
Gélose King A (annexe II)	Culture de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Gélose Chapman (annexe II)	Culture de <i>Sataphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>
Gélose Sabouraud au chloramphenicol (annexe II)	Culture de <i>Candida albicans</i>
Gélose MH (Mueller-Hinton) (annexe II)	Tests d'antibiogramme et aromatoگرامme

IV.2.5. Confirmation des isolats microbiens

Les microorganismes fournis par les laboratoires cités auparavant, sont transportés le plus rapidement possible dans des conditions d'asepsie adéquates, et sont traités directement au niveau du laboratoire pédagogique de microbiologie (n°1) au sein de la faculté des sciences de la nature et de la vie (Université de Mostaganem).

IV.2.5.1. Examen macroscopique

L'examen macroscopique des cultures est le premier examen effectué après incubation. Cette étude est basée sur des observations à l'œil nu et macroscopiques permettant de différencier les caractéristiques des espèces étudiées (**Boussena, 2020**).

IV.2.5.2. Examen microscopique

L'observation microscopique, permet d'étudier l'aspect morphologique des cellules d'une espèce microbienne. Elle comprend l'examen à l'état frais (examen entre lame et lamelle des microorganismes vivants) et l'examen après coloration, le plus souvent sur frottis séchés et fixés (**Arabi, 2018**).

IV.2.5.2.1. Examen a l'état frais

Ce test permet de déterminer la forme, l'arrangement et surtout la mobilité des bactéries. Il consiste l'observation d'une goutte de suspension bactérienne, préparée avec de l'eau physiologique stérile et placée entre lame et lamelle. L'observation se fait sous un microscope optique (**Boussena, 2020**).

IV.2.5.2.2. Examen après coloration de Gram

C'est la méthode le plus largement utilise en bactériologie pour distinguer les microorganismes sur la base de leur coloration, cette coloration divise les bactérie en deux

classe, des bactéries à coloration de Gram positive de couleur violette, et des bactéries à coloration de Gram négative de couleur rose (**Prescott et al., 2018**).

La coloration de Gram est basée sur l'affinité tinctoriale différente des bactéries à certains colorants due à la constitution de leur paroi. Cette coloration permet aussi d'observer la morphologie des bactéries (formes allongées pour les bacilles et arrondies pour les cocci). Le principe de la technique est le suivant (fig. 12) : le cristal violet oxalaté colore toutes les bactéries en violet, le lugol est un mordant qui fixe le violet, l'alcool décolore les bactéries qui ont une membrane perméable à l'alcool, la fuschine colore en rose les bactéries décolorées par l'alcool, ainsi, les bactéries à coloration de Gram négative sont colorées en rose et les bactéries à coloration de Gram positive en violet (**Astier-Théfennea et al, 2014**).

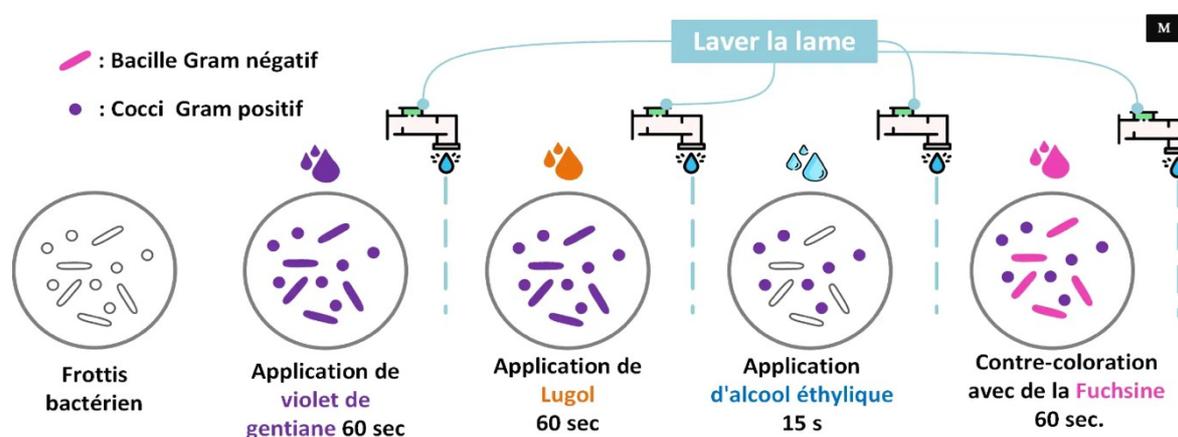


Figure n° 12. Technique de coloration de Gram, (<https://microbiologie-clinique.com/Coloration-Gram.html>).

IV.2.5.3. Tests biochimiques

IV.2.5.3.1. Test de la catalase

C'est une enzyme décomposant l'eau oxygénée en eau et en oxygène gazeux. La méthode (fig. 13), consiste à prélever une colonie du germe à étudier sur l'extrémité d'une anse de platine que l'on plonge ensuite dans une goutte d'eau oxygénée (à l'aide d'une pipette Pasteur). Le dégagement de bulles gazeuses indique la présence de l'enzyme (**Boussena, 2020**).

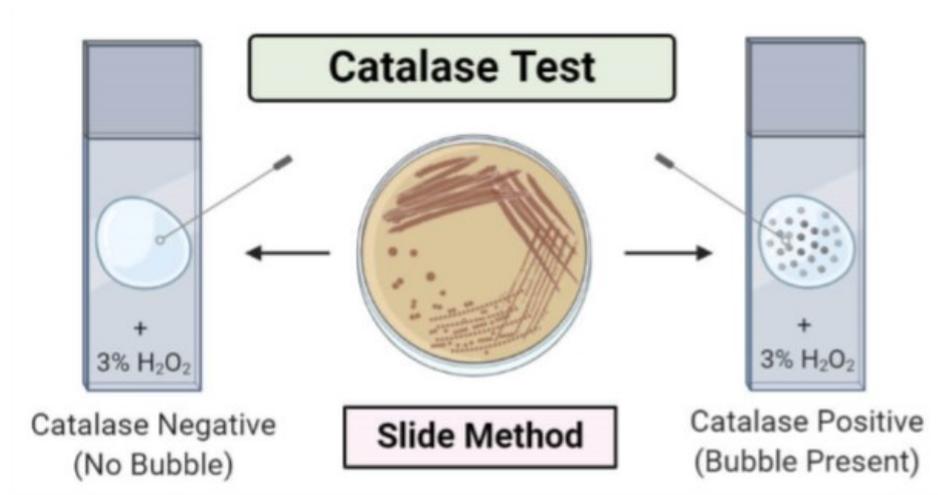


Figure n° 13. Schéma présenté la technique de teste de la catalase (<https://microbenotes.com>).

IV.2.5.3.2. Test de l'oxydase

Le test de l'oxydase, est basé sur une éventuelle production bactérienne d'une enzyme oxydase intracellulaire en présence d'oxygène atmosphérique et de cytochrome c. Pour déterminer l'activité oxydase, une colonie prélevée est mise sur le réactif oxydase (fig.14). Le développement d'une couleur violette dans un délai de 30s, signifie que le test est positif et que l'isolat possède l'enzyme oxydase (Bekada, 2019).

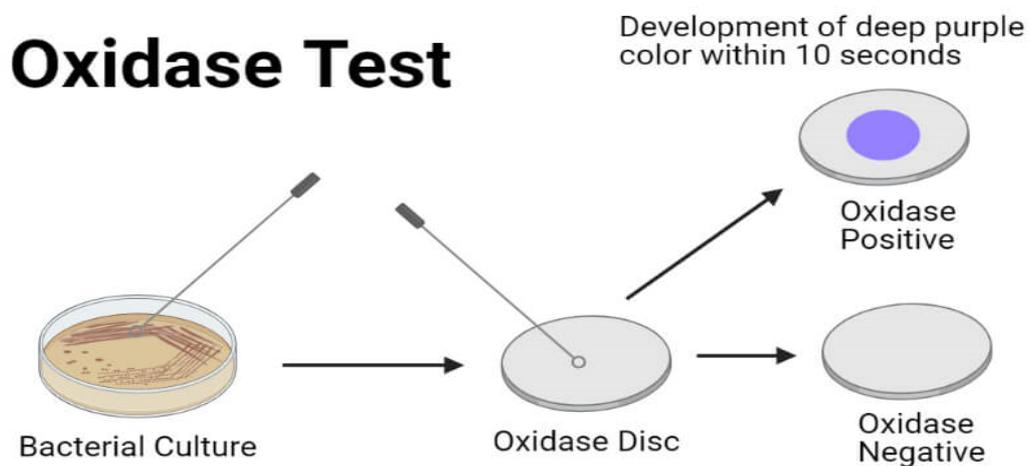


Figure n° 14. Schéma présenté la technique de test d'oxydase (<https://microbenotes.com/oxidase-test-principle-procedure-and-results/>)

IV.2.5.3.3. Test de la coagulase

Ce test utilisé pour détecter la présence d'une enzyme appelée coagulase.

En pratique (fig. 15), à l'aide d'une pipette stérile versez dans une tube stérile le plasma de lapin, et par une anse stérile, émulsifier 2 à 3 colonies des bactéries tester et mélanger délicatement. Le tube est incubé pendant 4 heure a 37°C au bout d'une heure, examiner le tube pour détecter toute formation de caillot en le penchant doucement sur la cote, en l'absence de tout formation de caillot évidente, revérifier toutes les 30 minutes jusqu'à une limite de 4 heure, s'il n'ya toujours pas de caillot au bout de 4 heure d'incubation réincuber le test à température ambiante pendant la durée restante, et vérifier la formation éventuelle de caillot au bout de 24 heures. Ne pas réincuber les tests ayant déjà produit un caillot au bout de 4 heures étant donnée que certaines souches de *S. aureus* produisent une fibrinolyse susceptible de lyser les caillots au terme d'une autre incubation (Boussena, 2020).

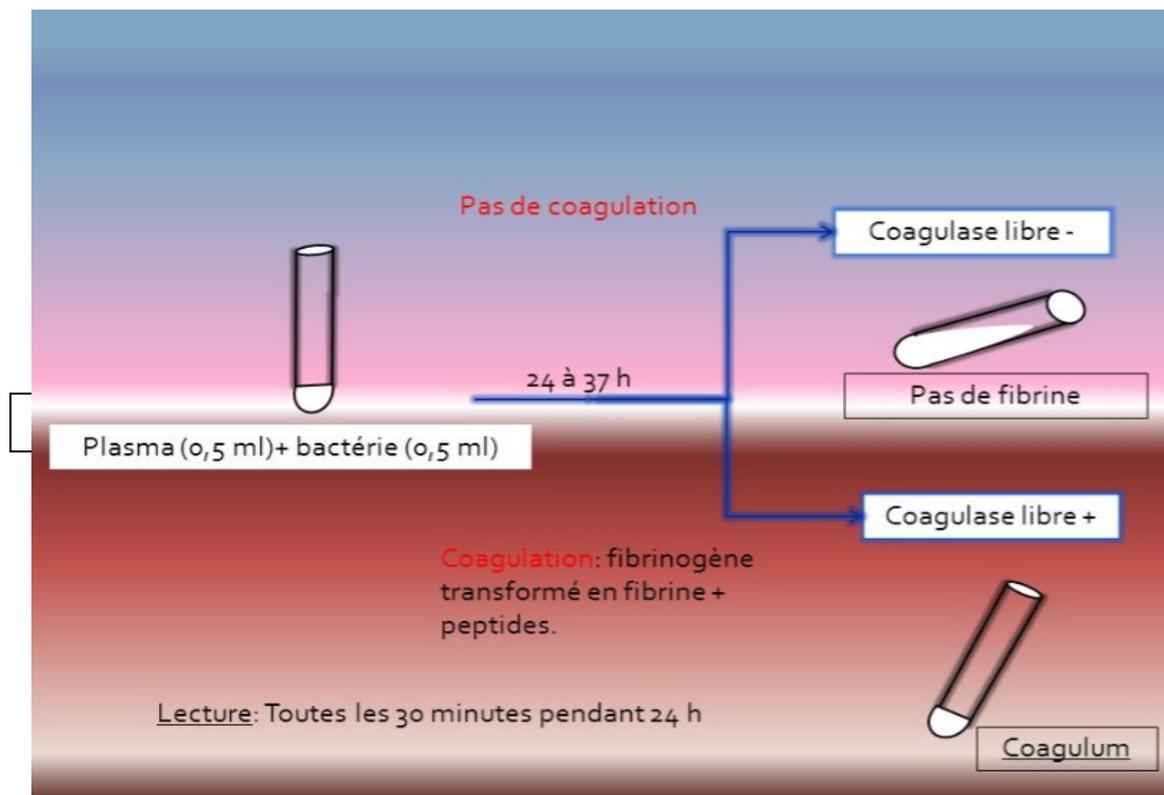


Figure n° 15. Technique du test de la coagulase (<https://slideplayer.fr/slide/1186837/>).

Concernant la confirmation de la levure *Candida albicans*, nous avons basé sur deux tests de confirmation ; examen à l'état frais et celui du tube germinatif.

IV.2.5.4. Test de tube germinatif

Est également appelé test de germination, est un test qui détecte *Candida albicans*, il s'agit de la culture dans un sérum sanguin.

Le tube germinatif permet un mode de germination d'une spore au cours duquel cette spore émet un prolongement dans lequel migre la totalité de son contenu, puis une cloison transversale sépare ce prolongement des filaments qui apparaissent alors comme une cellule vide, réduite à sa paroi (Ahmed *et al.*, 2010).

La mise en évidence de ce test (fig. 16) consiste à mettre 2ml du sérum humain dans un petit tube, et à l'aide d'une pipette pasteur stérile, touche une colonie de levure et l'émulsionner délicatement, puis incubé le tube à 37°C pendant 2 à 4h.

La lecture se fait par le transfert d'une goutte de sérum sur une lame pour observation microscopique.

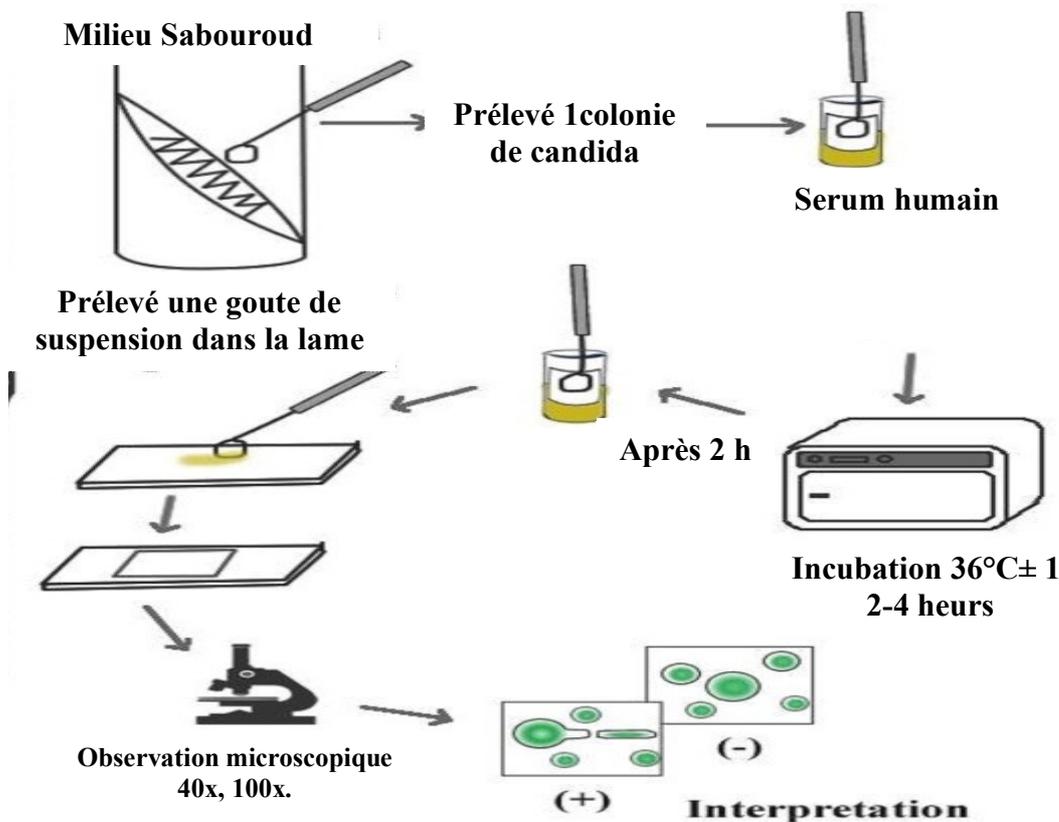


Figure n° 16. Test en tube Germinatif (Moya-salazar et Rojas ,2018).

IV.3. Antibiogramme / Antifongigramme (Méthode de diffusion en milieu gélosé)

La méthode de diffusion (fig. 17) est l'une des plus anciennes approches de détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques ou des levures aux antifongiques (OMS, 2005).

Une ou deux boîtes selon les cas, contenant le milieu de Mueller-Hinton (MH) (annexe II) spécifiquement destiné à cette méthode, sont ensemencés par écouvillonnage à l'aide de la suspension microbienne préalablement calibrée (Diane, 2020). A partir d'une culture jeune en solution salée pour atteindre une turbidité équivalente à celle de l'étalon 0,5 McFarland, ce qui correspond à un inoculum d'environ 10^8 UFC/ml pour les bactéries et 10^6 UFC/ml pour les levures. Pour ce faire, prélever plusieurs colonies de même morphologie (si possible) afin d'éviter de sélectionner un variant atypique. Mettre ces colonies en suspension en milieu salé avec un écouvillon. Il est recommandé d'employer un spectrophotomètre pour ajuster l'inoculum (Aubain *et al.*, 2021), à 0.5 McFarland exprimer par une densité optique de 0.08-0.1, déterminer par la mesure de la transmittance à une longueur d'onde (λ) de 620 nm pour les bactéries (Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale, 2005) et 625 nm pour les levures (Boulevard, 2006).

Les antibiotiques choisis (tableau 04), selon la comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie Aubain *et al.* (2021), et concernant l'antifongique, seule une solution à 1% de Fluconazole (150 mg) a été préparée pour être utiliser contre *Candida albicans*, les disques sont alors disposés à la surface de la gélose à l'aide d'un distributeur automatique ou d'une pince stérile en appuyant légèrement et l'antibiotique diffuse très rapidement de manière concentrique autour de chaque disque. Les boîtes peuvent alors être mises en incubation à 37°C, 25+/- 2°C pour les levures dans les conditions requises.

La lecture et l'interprétation peuvent s'effectuer dans un délai minimal de 16 à 18 heures. La lecture consiste à mesurer les diamètres de la zone d'inhibition de la culture autour de chaque disque à l'aide d'un pied à coulisse (annexe III) (Diane, 2020). Si la culture est insuffisante après 24 heures d'incubation au cas des levures, ré-incuber la boîte 24 heures supplémentaires et effectuer la lecture à 48 heures.

En effet, il est possible d'observer sur les bords des zones d'inhibition, une inhibition partielle de la culture avec la présence de colonies de petite et de moyenne taille. Ces colonies ne correspondent pas à des mutants résistants et ne doivent pas être prises en compte pour la mesure des diamètres des zones d'inhibition (Boulevard, 2006).

Tableau n° 4. Liste des antibiotiques testés sur les isolats.

Famille	Antibiotique	Abréviation	Charge de disque en µg
Penicilline	Amoxiciline	AML	25
	Oxaciline	OX	5
	Pipéracilline	PRL	100
Aminoglycoside	Gentamicine	CN	120
Tétracyclines	Doxycycline	DO	30
	Tétracycline	TE	30
Sulfonamides	Acide cotrimoxazole	CMXA	25
	Cotrimoxazole	STX	25
Quinolones	Ciproflaxacine	CIP	5
Phénicoles	Chloramphicol	CHL/ C	30
Poly peptides	Colistine	COL	10
Céphalosporines	Cefotaxime	CTX	30
	Cefepime	FEP	30
	Ceftazidime	CAZ	30
Carboxypénicillines	Ticarcline	TI	75
	Ticarcillin/Colavulanic acid	TIM	75
fluoroquinolones	Levofloxacin	LE	5
Carbapenem	Imipenem	IPM	10

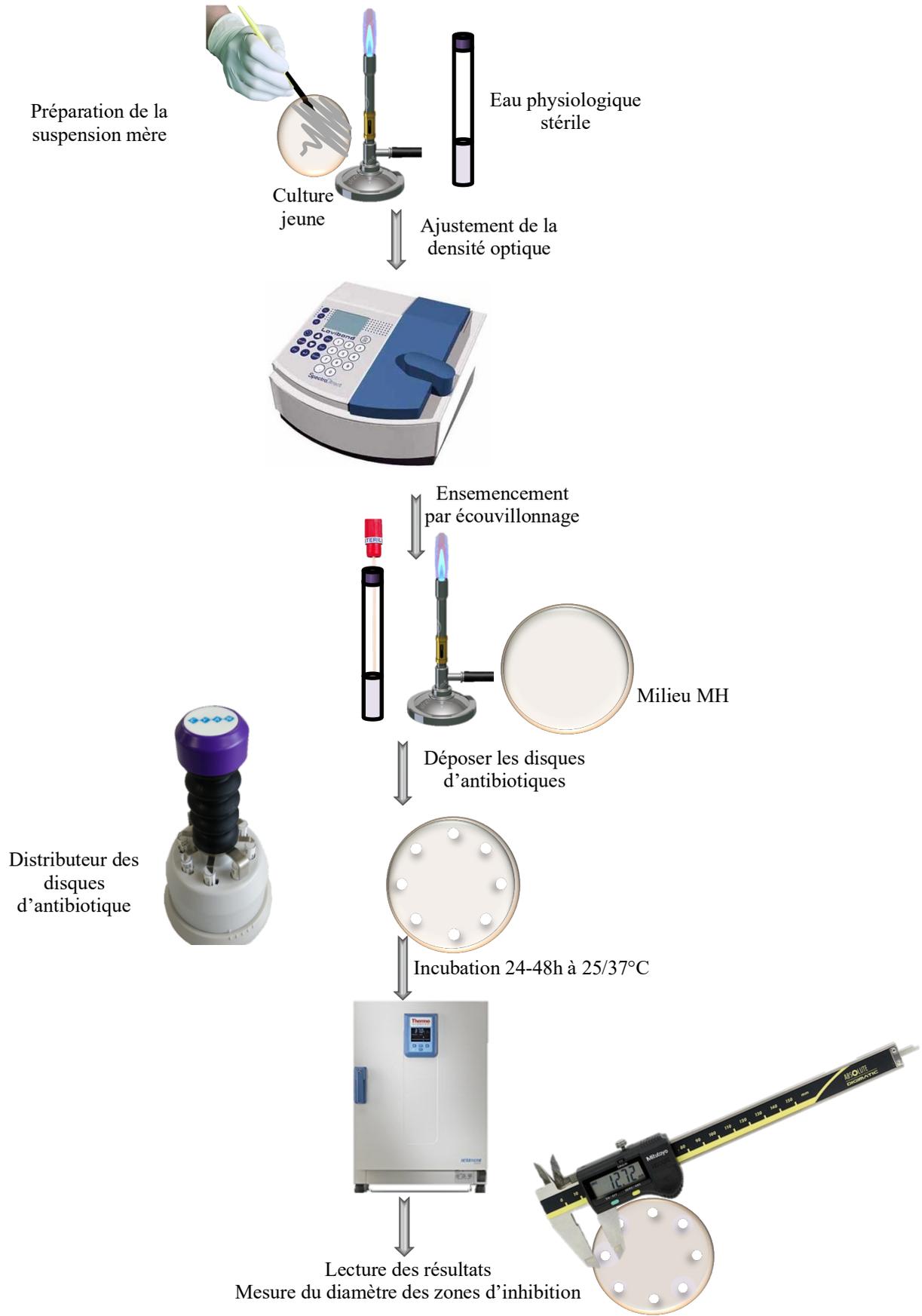


Figure n° 17. Technique d'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé (méthode des disques).

IV.4. Étude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Artemisia herba alba longa*

IV.4.1. Matériel végétal

La plante qui a fait l'objet de notre étude est connue par le nom « Chih », elle a été choisie sur la base de ses utilisations en médecine traditionnelle locale. La partie aérienne de *Artemisia herba alba* a été récoltée en pleine floraison pendant le mois de Mars 2022 dans la région de Brezina à Elbayadh du sud-ouest de l'Algérie (coordonnées géographiques : 33° 5' 59" Nord, 1° 15' 25" Est) (fig. 18).



Figure n° 18. Cartographie de la zone d'échantillonnage (<http://www.maplandia.com>).

IV.4.2. Procédé d'extraction des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont extraites par entraînement à la vapeur d'eau (fig. 19). 500g de matériel végétal sèche (partie aérienne de la plante) est posée au-dessus de la grille du récipient préalablement remplis de 2,5 litre d'eau distillée, l'ensemble est porté à l'ébullition pendant 2 heures sur une plaque chauffante à 220 °C. Les vapeurs chargées des HES passent à travers le tube vertical, puis dans le réfrigérant où aura lieu la condensation. Les gouttelettes ainsi produites s'accumulent dans le tube rempli auparavant d'eau distillée. En raison de la différence de densité, les HES surnagent à la surface de l'eau. Sont récupérée, mesurée et pesée

pour déterminer le rendement en fonction de la matière sèche. Puis sont conservées dans des tubes ombrés et hermétiques (Abdelli, 2017).



Figure n° 19. Dispositif d'extraction des huiles essentielles par entrainement à la vapeur d'eau.

IV.4.3. Détermination de rendement de l'extraction

Le rendement en huiles essentielles est défini comme étant le rapport de la masse des huiles essentielles et la masse du matériel végétal sec utilisé pendant l'extraction, il est calculé selon la formule suivante:

$$R_{HEs} = M_{HE}/M_{PS} \times 100$$

R_{HE} : Rendement en huile essentielle (%);

M_{HE} : Masse des huiles essentielles obtenue (g);

M_{PS} : Masse de la plante sèche traitée (g) (Bouguerra, 2012).

IV.4.4. Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles

IV.4.4.1. Aromatogramme

C'est une technique de laboratoire qui peut élucider les activités antimicrobiennes des huiles essentielles en relation avec des pathogènes microbiens spécifiques (Rhind, 2012). Il ya différents types d'aromatogrammes sur milieu solides ou liquide, cependant plusieurs études

ont convenues que la méthode sur milieu solide est la plus facile et la plus simple et dans notre travail nous avons utilisé la méthode en milieu solide.

Ce test concerne les 10 isolats apparus résistants aux antibiotiques parmi 18 isolats (18 isolats sensibles aux antibiotiques).

Des disques stériles de papier Wattman de 6 mm de diamètre (fig. 20), contenant 5µl des HEs supplémentée de 10% de DMSO, sont déposés à l'aide d'une pince stérile à la surface d'un milieu gélosé MH, préalablement ensemencé par écouvillonnage avec 100 µl de suspension microbienne dont la turbidité a été ajustée à une longueur d'onde ($\lambda=620$ nm) entre 0,08 - 0,1 (10^8 UFC/ml). Des témoins DMSO ont été utilisés comme contrôle négatif (**Abdelli, 2017**). Les boîtes sont déposées dans un réfrigérateur à 4°C pendant une heure pour assurer une bonne diffusion des huiles essentielles dans la gélose. Le diamètre de la zone d'inhibition est mesuré après une incubation de 24 h à 37 °C pour les bactéries à l'aide d'une pied à coulisse (**Bouزيد, 2018**).

Selon le diamètre d'inhibition, les souches sont classées en se basant sur leur sensibilité aux huiles essentielles comme suit : bactéries résistantes ($\varnothing \leq 8$ mm), bactéries sensibles ($9 \text{ mm} \leq \varnothing \leq 14$ mm), bactéries très sensibles ($15 \text{ mm} \leq \varnothing \leq 19$ mm) et bactéries extrêmement sensibles ($\varnothing \geq 20$ mm) (**Ponce *et al.*, 2003**).

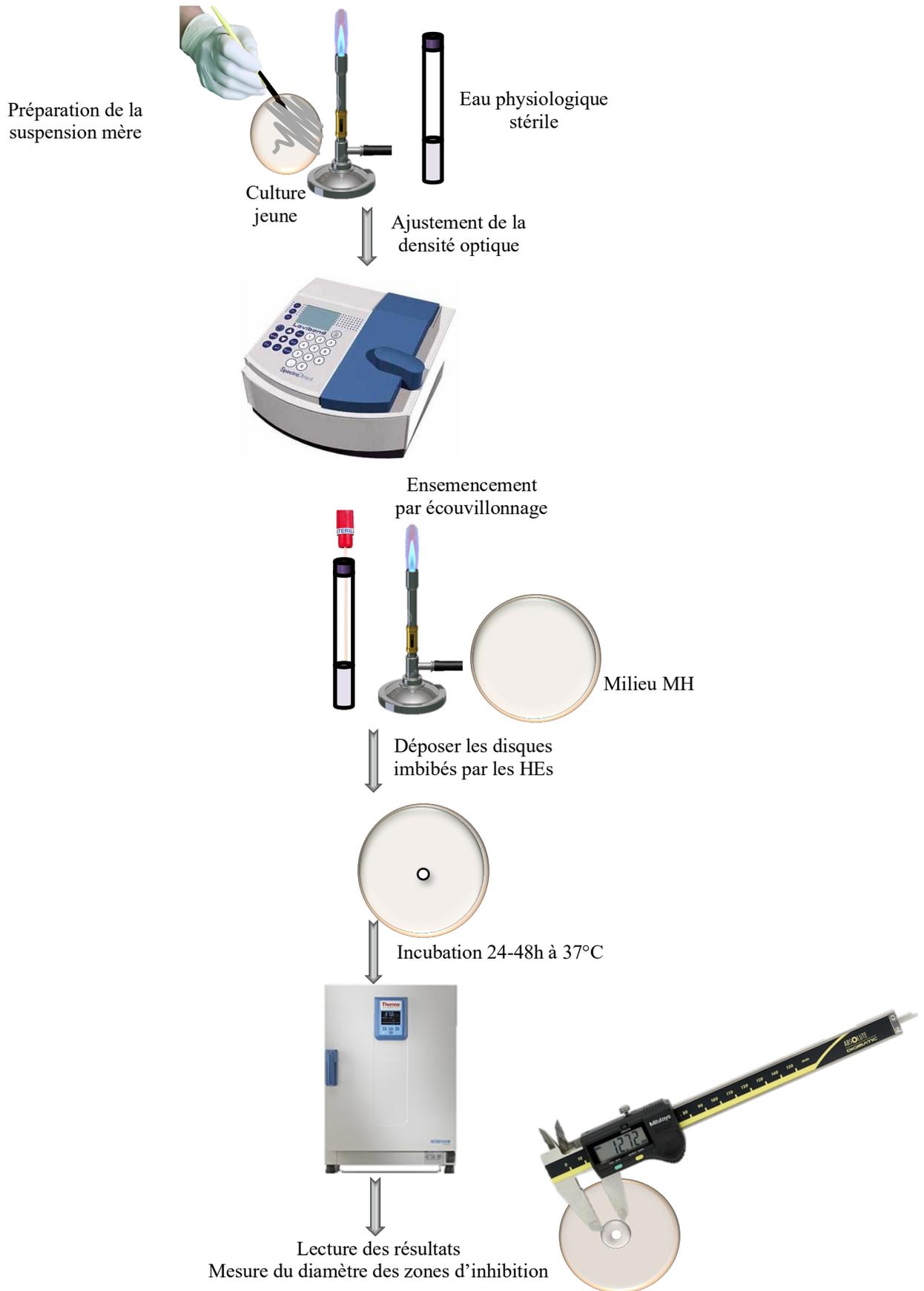


Figure n° 20. Technique d'aromatogramme par diffusion en milieu gélosé (méthode des disques).

IV.4.4.2. Détermination CMI (concentration minimale inhibitrice)

La CMI correspond à la plus faible concentration en huiles essentielles capable d'inhiber la croissance bactérienne, cette technique consiste à inoculer par un inoculum standardisé et une gamme de concentration décroissant en huiles essentielles (**Guinoiseau, 2010**).

Sa détermination a été réalisée par la méthode de macrodilution en milieu liquide (fig. 21). Les huiles essentielles sont tout d'abord préparées par émulsion dans une solution de DMSO à raison de 10% afin de disperser les composés et d'améliorer leur contact avec les germes à tester. Des dilutions successives de la solution obtenue par progression géométrique de raison 2 de façon à obtenir les dilutions suivantes : 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 et 1/128.

La gamme de concentrations finales d'huile essentielle utilisée va de 0.0781 à 10 µl/ml (v/v). 0,2 ml de chacune des solutions des huiles essentielles est introduit dans un tube de la série expérimentale contenant 1,8 ml d'une suspension bactérienne préparée dans le bouillon Mueller Hinton et dont la turbidité est ajustée à 10^8 bactéries/ml (**Abdeli, 2017**).

La lecture des résultats se fait à l'œil nu par observation du changement de turbidité dans les tubes après incubation et par comparaison avec les contrôles (un tube ne contenant que le milieu de culture et l'inoculum et le DMSO est utilisé comme contrôle négatif). Les essais sont effectués en triple pour chacune des concentrations des huiles essentielles utilisées. La CMI correspond à la plus faible concentration des huiles essentielles à laquelle aucune croissance microbienne n'est visible (**Oussou et al., 2004**).

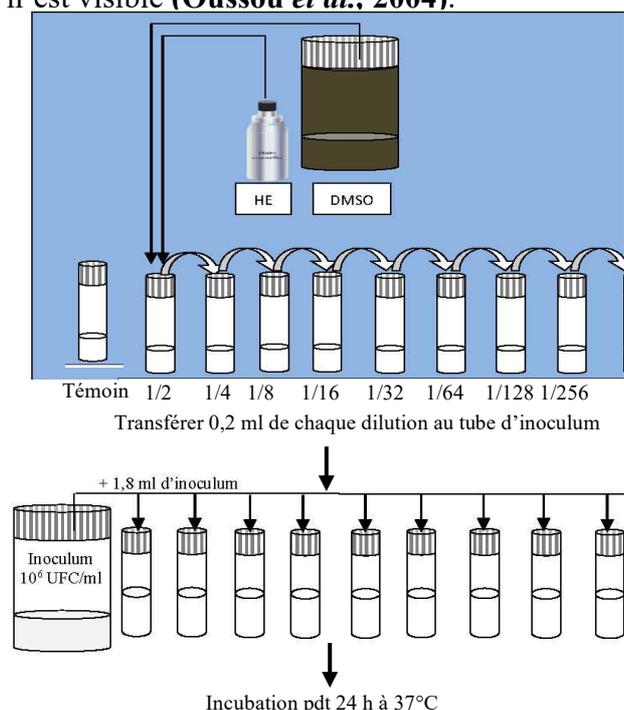


Figure n° 21. Méthode de la détermination de la CMI.

Chapitre V



Résultats & Discussion

V.1. Revivification et confirmation des isolats microbiens étudiés

V.1.1. Examen macroscopique

Après ensemencement sur des milieux différents et une incubation de 24 h à 37°C pour les cultures bactériennes (24 - 48 h à 25°C pour la levure), l'aspect macroscopique apparu comme suit :

- Après incubation de 24 h à 37°C sur le milieu BCP, l'observation macroscopique montre des colonies de taille moyenne (1 à 2 mm) rondes plus ou moins régulières de couleur jaune, due à l'acidité du milieu, donc lactose (+) et peu bombées de *E. coli* (fig. 22).

Le milieu BCP facilite la différenciation des colonies par le caractère lactose. Il contient une base nutritive ordinaire permettant la croissance des bactéries non exigeantes et le lactose comme un critère de différenciation : la fermentation du lactose révélée par le virage de couleur du milieu.

Colonies jaunes ; bactéries lactose +,

Colonies bleues ; bactéries lactose –.

La présence d'une β -galactosidase conduit à la dégradation du lactose présent dans le milieu, le pH de celui-ci diminué et est révélé par le virage de l'indicateur coloré, le pourpre de Bromocrésol (**Vernozy-rozand et al., 1997**).

- Sur milieu Hektoen (fig. 23), et après l'incubation nous avons constatés des colonies de couleur bleu verte de 2 à 4 mm diamètre et pas de changement de couleur de milieu, indique l'absence de l'acidification de milieu.

L'isolement et identification des *Shigella dysenteriae* sont donc délicats. Et les colonies suspectes sur milieu Hektoen apparait vertes (lactose-, saccharose-, salisine-, H₂S-) (**Denis et al., 2016**).

- Sur le milieu gélosé King A, les colonies de taille moyenne (1 à 2 mm) bleu à contour irrégulier, irisées ou métalliques, odeur de seringat ou de miel sont suspecte d'être *Pseudomonas aeruginosa* (fig. 24). Ces mêmes caractéristiques ont été constatées par **Denis et al. (2016)** où peuvent êtres sur milieu solide observés trois types des colonies simultanément ou deux de manière isolée : colonies larges de 2 à 3 mm de diamètres, à bords irrégulier, avec une partie centrale présente des reflets métalliques ; colonies plus petites lisses bombées à bords régulier et colonies muqueuses, filantes, rencontrés chez

les souches produisent un polymère exopolysaccharidique appelé alginate, pour les souches pigmentent, les milieux de king A et king B.

- Sur milieu Chapman, des colonies (de 1 à 2 mm de diamètre) lisses, rondes, colorés au jaune (ce virage de couleur est un indice de fermentation de mannitol par la bactérie avec acidification du milieu), caractérisent le genre *Staphylococcus*, certaines souches produisent un pigment jaune orangé (fig. 25), mais cette production est irrégulière, car certaines donnent des colonies blanches ; le caractère pigmentaire n'est pas propre à l'espèce (Avril *et al.*, 2000).
- Une croissance faible sur ce même milieu (Chapman), à donner des petites colonies blanches non acidifiantes du milieu, qui particularisent le genre *Enterococcus*. Les bactéries du genre *Enterococcus* sont peu exigeantes en facteurs de croissance et peuvent donc se multiplier aisément sur les géloses ordinaires Trypticase-Soja (TS). Les colonies d'entérocoques apparaissent alors translucides (sauf *E. casseliflavus* qui présentent une légère pigmentation jaune) avec un diamètre inférieur à 1 mm. Certaines souches de *Enterococcus faecalis* sont β -hémolytiques sur géloses au sang (Isnard, 2017).
- Le milieu Sabouraud a permis le poussé des colonies blanches, crémeuses et brillantes de formes rondes et bombées, grandes et lisses. Les mêmes caractères morphologiques des colonies de *Candida albicans* (fig. 26) ont été observés par Kammalac (2014).



Figure n°22. Aspect macroscopique de *Escherichia coli* sur milieu BCP.

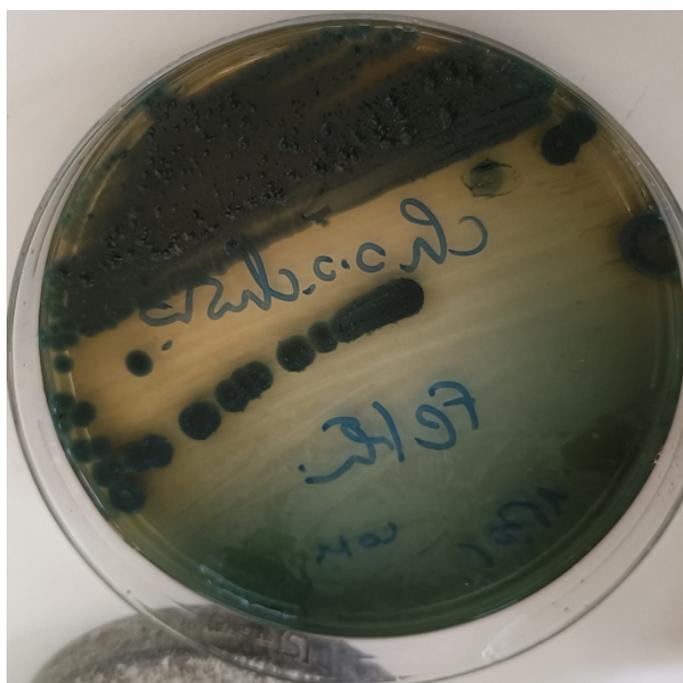


Figure n°23. Aspect macroscopique de *Shigella dysenteriae* sur milieu Hektoen.



Figure n°24. Aspect macroscopique de *Pseudomonas aeruginosa* sur milieu King A.



Figure n° 25. Aspect macroscopique de *Staphylococcus aureus* sur milieu Chapman.

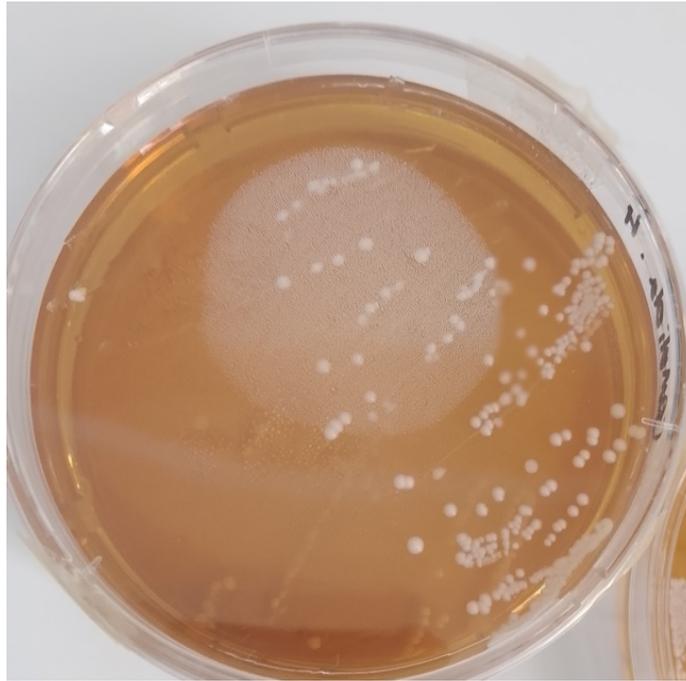


Figure n° 26. Aspect macroscopique de *Candida albicans* sur milieu Sabouraud.

V.1.2. Examen microscopique

V.1.2.1. Examen à l'état frais

Les microorganismes examinés à l'état frais apparaissent mobiles ou immobiles selon l'espèce (tableau 5).

Pseudomonas aerogenosa est mobile à la fois en milieu liquide, grâce à son unique flagelle polaire (monotriche) qui lui permet de nager, et en milieu solide, grâce aux pilis qui lui permettent de se déplacer par glissement. Elle peut également se déplacer dans des milieux semi-solides grâce au flagelle (**Perdu, 2013**).

Les espèces mobiles des entérobactéries sont les plus nombreuses, grâce à une ciliature péritriche. Sous microscope *E. coli*, elle est mobile. C'est une bactérie dotée de mobilité, grâce à plusieurs (une dizaine) flagelles disposés tout autour de la bactérie. Certaines sont immobiles (*Shigella dysenteriae*,) (**Khayer, 2011**).

Tableau n° 05. Mobilité des espèces microbiennes étudiées.

N° des isolats	Espèces	Mobilité
I ₁ , I ₁₀ , I ₁₅ , I ₁₇ , I ₁₈ , I ₁₉ et I ₂₃	<i>Escherichia coli</i>	Mobile
I ₂	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Mobile
I ₃ , I ₇ , I ₈ et I ₁₁	<i>Staphylococcus aureus</i>	Immobile
I ₅ et I ₆	<i>Candida albicans</i>	Immobile
I ₁₂ et I ₁₄	<i>Enterococcus faecalis</i>	Immobile
I ₂₁ et I ₂₂	<i>Shigella dysenteriae</i>	Immobile

V.1.2.2. Coloration de Gram

Le (tableau 06) montre la présence de 3 bactéries roses, donc Gram négatif et de forme bacillaire ; *Escherichia coli* (fig. 27), *Shigella dysenteriae* (fig. 28) *Pseudomonas aeruginosa* (fig. 29), et deux autres bactéries violettes donc Gram positif, de forme cocci ; *Staphylococcus aureus* (fig. 30) et *Enterococcus faecalis* (fig. 31).

Les bactéries à coloration de Gram+, sont généralement caractérisées par la présence d'un peptidoglycane épais (20 à 80 nm) séparé de la membrane plasmique par un espace périplasmique tandis que les bactéries dites Gram- possèdent du périplasme et un peptidoglycane fin (1 à 8 nm) sur lequel repose une deuxième bicouche lipidique dans laquelle s'insèrent des porines (Huc, 2011).

Tableau n° 06. Résultats de la coloration de Gram des espèces étudiées.

N° des isolts	Souche bactérienne	Morphologie	Couleur	Gram
I ₁ , I ₁₀ , I ₁₅ , I ₁₇ , I ₁₈ , I ₁₉ et I ₂₃	<i>Escherichia coli</i>	Bacille	Rose	Négatif
I ₂	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacille	Rose	Négatif
I ₃ , I ₇ , I ₈ et I ₁₁	<i>Staphylococcus aureus</i>	Cocci	Violette	Positif
I ₅ et I ₆	<i>Candida albicans</i>	Ovale	/	/
I ₁₂ et I ₁₄	<i>Enterococcus faecalis</i>	Cocci	Violette	Positif
I ₂₁ et I ₂₂	<i>Shigella dysenteriae</i>	Bacille	Rose	Négatif

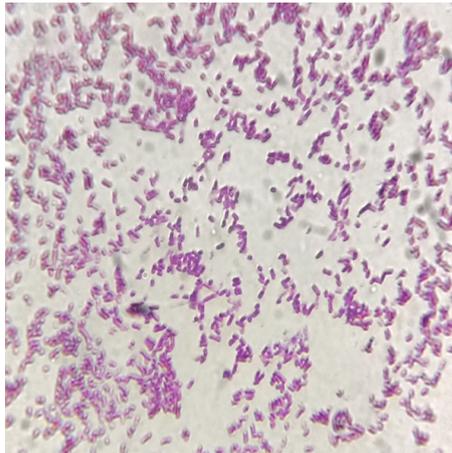


Figure n° 27. Aspect microscopique de *Escherichia coli* après coloration de Gram

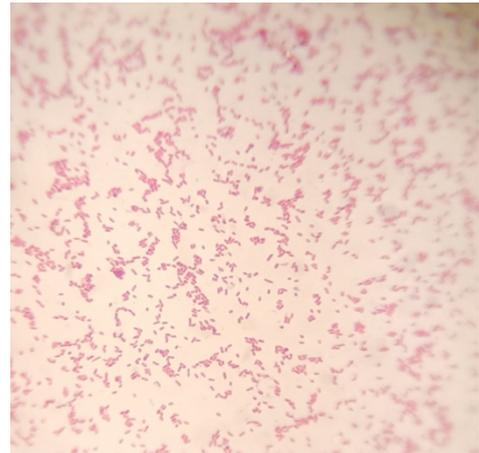


Figure n° 28. Aspect microscopique de *Shigella dysenteriae* après coloration de Gram

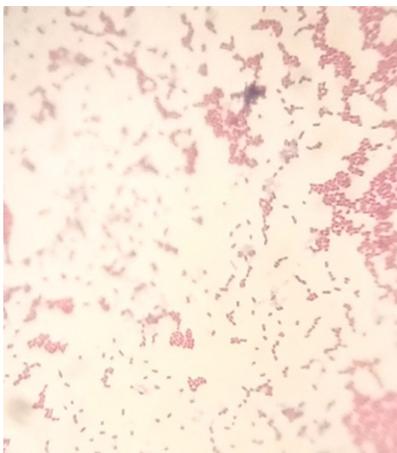


Figure n° 29. Aspect microscopique de *Pseudomonas aeruginosa* après coloration de Gram

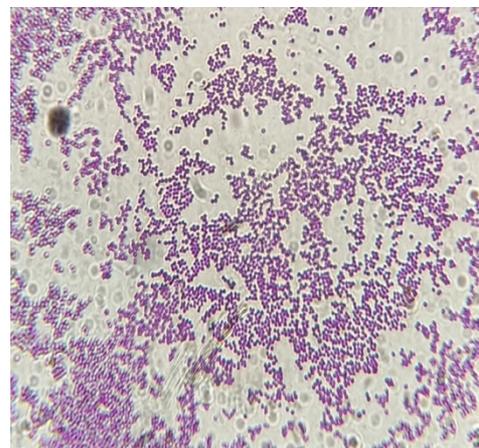


Figure n° 30. Aspect microscopique de *Staphylococcus aureus* après coloration de Gram

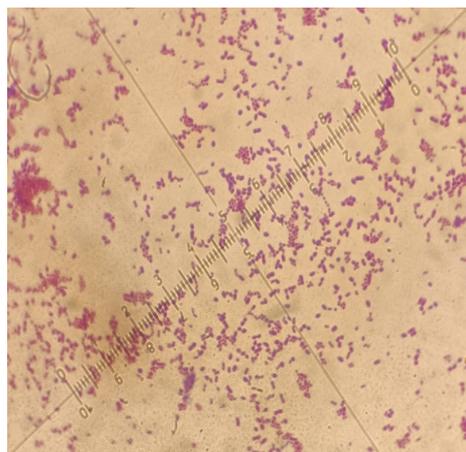


Figure n° 31. Aspect microscopique de *Enterococcus dysenteriae* après coloration de Gram

Pour la levure *Candida albicans*, à l'état frais montre des éléments cellulaires arrondis ou ovalaires à paroi mince et non capsulés, de 1 à 10 μm avec un ou plusieurs bourgeonnements. Ces mêmes caractéristiques sont observées par **Pianetti (2015)**.

Au microscope optique nous observons la levure *Candida albicans* (fig. 32) colorée en bleu sombre (au bleu de méthylène) avec une forme ovale. Cette coloration est intéressante pour l'observation rapide des frottis mais elle permet seulement l'étude de la morphologie des microorganismes (**Kamlac, 2014**).

Par ailleurs, après 3 à 4 h d'incubation la colonie de *Candida albicans* est observée au microscope optique (un grossissement de 40X) produisant un tube germinatif (fig. 33).

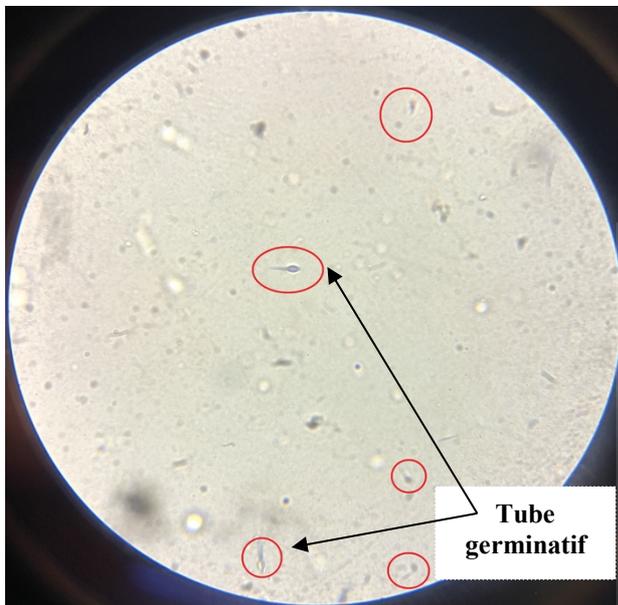


Figure n° 33. Aspect microscopique de du tube germinative chez *Candida albicans*

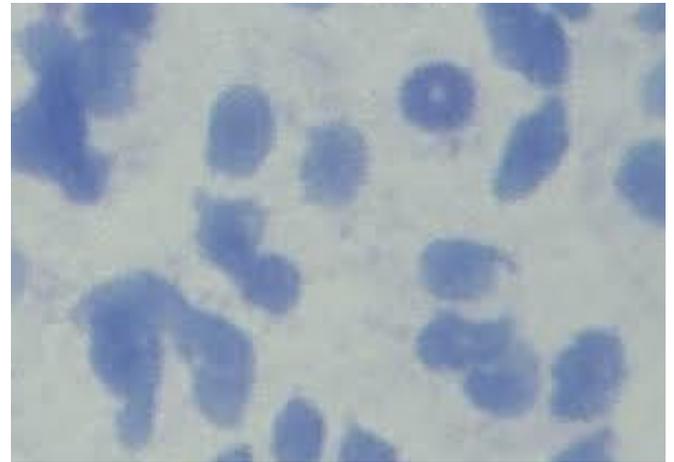


Figure n° 32. Observation microscopique de *Candida albicans* après coloration au bleu de méthylène.

V.1.3. Tests biochimiques

La confirmation des isolats est basée sur trois autres tests complémentaires ; la recherche des enzymes (Catalase, oxydase et coagulase), dont les résultats sont mentionnés dans le tableau suivant :

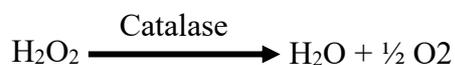
Tableau n° 07. Résultats des tests de type respiratoire des tests biochimiques.

N°	Microorganisme	Catalase	Oxydase	Coagulase
I ₁ , I ₁₀ , I ₁₅ , I ₁₇ , I ₁₈ , I ₁₉ et I ₂₃	<i>Escherichia coli</i>	+	-	/
I ₂	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	-	/
I ₃ , I ₇ , I ₈ et I ₁₁	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	+
I ₁₂ et I ₁₄	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	/
I ₂₁ et I ₂₂	<i>Shigella dysenteriae</i>	+	-	/

- : Négatif,

+ : Positif,

En présence d'oxygène moléculaire, certaines réactions métaboliques conduisent à la formation d'eau oxygénée. La présence d'une catalase active chez les bactéries isolées est traduite, par un dégagement gazeux abondant sous la forme de mousse ou de bulles d'oxygène (fig. 34), due à la dégradation de l'eau oxygénée formée, en eau et en oxygène comme l'indique la réaction suivante (Holt *et al.*, 1994) :

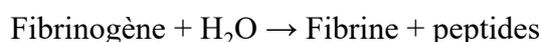


Le test de l'oxydase positif, met en évidence la présence d'une cytochromeoxydase qui oxyde le cytochrome (c) réduit. La présence de ce dernier dans les chaînes respiratoires grâce à des réactifs ayant le même potentiel d'oxydo-réduction que le cytochrome (c) (N-méthylé du paraphénylène diamine). L'existence d'une cytochrome-oxydase se traduit, en 20 à 60 secondes, par l'apparition d'une coloration rouge virant rapidement au violet très foncé (fig. 35) (Megraud, 1996). La réaction est schématiquement la suivante :



Donc la bactérie testée à oxyder la forme réduite incolore des dérivés N-méthylé du paraphénylène diamine, à sa forme oxydée semi-quinonique rose-violacée.

Pour *Staphylococcus aureus*, la réaction de la coagulation (fig. 36) est considérée comme positive puisque le coagulum occupe plus de 3/4 du volume initialement mis en jeu.



En principe, la coagulation se manifeste en moins de 3 heures et le plus souvent le caillot adhère aux parois du tube. Parfois la coagulation se produit plus lentement ; dans ce cas la réaction doit être considérée comme positive, si un caillot apparaît en moins de 24 heures.



Figure n° 34. Résultat du test de la catalase chez (*E. coli*, *Pseudomonas*, *S. aureus* et *Shigilla dysenteriae*).

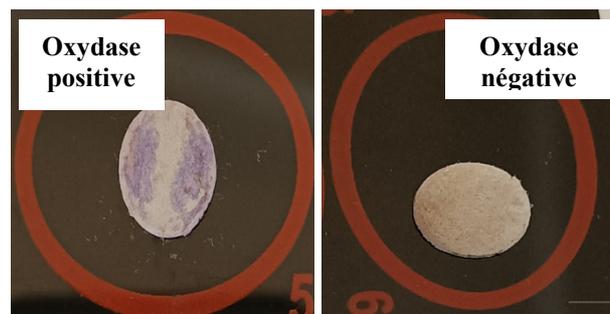


Figure n° 35. Résultat du test de l'oxydase (*E. coli*, *Pseudomonas*, *S. aureus* et *Shigilla dysenteriae*)..



Figure n° 36. Résultat du test de la coagulase chez *S. aureus*.

V.2. Antibiogramme

L'étude de la sensibilité par la méthode des disques des antibiotiques a été utilisée pour l'ensemble des 18 isolats microbiens. Il nous a donné les résultats après incubation à 37 °C pendant 24 à 48 heures.

Les résultats indiqués dans les tableaux (08 et 09) montrent que les 7 isolats de *E. coli* sont résistantes à la Cefotaxime, Colistine, Oxacilline et Ticarcilline, et les 2 isolats de *Shigella dysenteriae* sont aussi résistantes à Ticarcilline + acide clavulanique et Piperacilline dont les diamètres d'inhibition sont respectivement (6 - 22 mm et 6 - 12 mm) (fig. 37 et 38). Ces deux germes ont des résistances envers les bêta-lactamines. **Toudji et al. (2017)** avaient expliqué la caractérisation des souches d'entérobactéries BLSE (Les bêta-lactamases à spectre étendu), sont donc des souches multirésistantes. Les bêta-lactamases produites par ces souches ont inactivées toutes les bêta-lactamines. Cela confirme un choix thérapeutique extrêmement limité pour les patients.

Tableau n°08. Résultats de l'antibiogramme de *E. coli*.

Antibiotique	Diamètre critique (mm)			I ₁		I ₁₀		I ₁₅	
	R	I	S	Ø (mm)	Résultat	Ø (mm)	Résultat	Ø (mm)	Résultat
Chloramphenicol	≤17	-	≥17	26	S	26	S	25	S
Cefalexine	≤16	17	≥18	28	S	18	S	24	S
Ciprofloxacine	≤15	16-20	≥21	18	I	36	S	34	S
Colistine	≤15	-	≥15	6	R	10	R	6	R
Cefotaxime	≤23	24-25	≥26	16	R	26	S	6	R
Oxacilline	≤20	-	≥20	16	R	6	R	/	/
Sulfaméthoxazole	≤13	14-15	≥16	26	S	16	S	24	S
Ticarcilline	≤23	-	≥23	14	R	16	R	6	R

Antibiotique	Diamètre critique (mm)			I ₁₇		I ₁₈		I ₁₉		I ₂₃	
	R	I	S	Ø (mm)	Résultat						
Chloramphenicol	≤17	-	≥17	12	R	24	S	34	S	30	S
Cefalexine	≤16	17	≥18	20	S	25	S	22	S	26	S
Ciprofloxacine	≤15	16-20	≥21	30	S	32	S	36	S	46	S
Colistine	≤15	-	≥15	10	R	10	R	10	R	10	R
Cefotaxime	≤23	24-25	≥26	24	I	20	R	20	R	22	R
Oxacilline	≤20	-	≥20	/	/	/	/	/	/	/	/
Sulfaméthoxazole	≤13	14-15	≥16	6	R	26	S	16	S	30	S
Ticarcilline	≤23	-	≥23	6	R	6	R	6	R	/	/

Tableau n° 09. Résultats de l'antibiogramme de *Shigella dysenteriae*.

Antibiotique	Diamètre critique (mm)			I ₂₁		I ₂₂	
	R	I	S	Ø (mm)	Résultat	Ø (mm)	Résultat
Ciprofloxacine	≤21	22-49	≥50	12	R	24	S
Cefotaxime	≤23	24-25	≥26	26	S	26	S
Imipeneme	≤18	19-20	≥21	30	S	28	S
Piperacilline	≤17	18-19	≥20	6	R	6	R
Ticarcilline + acide clavulanique	≤20	21-22	≥23	6	R	6	R

Les résultats indiqués dans le tableau 10 et l'histogramme (fig. 39) montrent que, *Pseudomonas aeruginosa* est résistante aux Doxycycline, Piperacilline, Tétracycline, Ticarcilline et Ticarcilline + acide clavulanique avec des diamètres d'inhibition de 10, 10, 8, 6 et 6 mm respectivement, et au même temps cette souche est sensible aux Cefalexine, Ciprofloxacine, et Levofloxacine avec des diamètres d'inhibition de 20, 30 et 30 mm respectivement.

Cette résistance peut être due à la diminution de la concentration intracellulaire des β-lactames par la production de métallob-β-lactamases (MBLs) ou par l'augmentation de l'expression des pompes d'efflux comme MexAB, MexCD et MexXY. Ces mécanismes de résistance aux β-lactamines sont les plus répandus chez *Pseudomonas aeruginosa* (Lattab, 2018).

Tableau n°10. Résultats de l'antibiogramme de *Pseudomonas aeruginosa*.

Antibiotique	Diamètre critique (mm)			I ₂	
	R	I	S	Ø (mm)	Résultat
Cefalexine	≤16	-	≥16	20	S
Ciprofloxacine	≤25	26-32	≥33	30	I
Doxycycline	≤15	16-17	≥18	10	R
Levofloxacine	≤19	20-25	≥26	30	S
Piperacilline	≤18	19-49	≥50	10	R
Tétracycline	≤17	18	≥19	8	R
Ticarcilline	≤18	19-49	≥50	6	R
Ticarcilline + acide clavulanique	≤20	21-27	≥28	6	R

Les 4 isolats de *Staphylococcus aureus* (tableau 11) sont présentés une résistance vis à vis aux antibiotiques testés ; Cefotaxime, Oxacilline, Tétracycline avec des diamètres d'inhibition de 6, 6, et 16-18 mm respectivement, dont ils ont été sensibles au chloramphénicol et à la Cefalexine (fig. 40).

Cette résistance est prouvée par **Leclercq (2002)** le taux de résistance des staphylocoques dorés isolés en milieu hospitalier est élevé. Plus que la fréquence des résistances à l'oxacilline, qui semble s'être relativement stabilisée après avoir récemment diminuée, le fait nouveau est la variété de plus en plus grande des phénotypes de résistance avec une plus fréquente sensibilité à la gentamicine.

Tableau n° 11. Résultats de l'antibiogramme de *Staphylococcus aureus*.

Antibiotique	Diamètre critique (mm)			I ₃		I ₇		I ₈		I ₁₁	
	R	I	S	Ø (mm)	Résultat	Ø (mm)	Résultat	Ø (mm)	Résultat	Ø (mm)	Résultat
Chloramphenicol	≤18	-	≥18	24	S	24	S	26	S	24	S
Cefalexine	≤20	-	≥20	24	S	26	S	26	S	28	S
Cefotaxime	≤23	24-25	≥26	6	R	6	R	6	R	6	R
Oxacilline	≤21	-	≥21	6	R	6	R	6	R	6	R
Tetracycline	≤19	20-21	≥22	16	R	18	R	18	R	18	R

De même le groupe de *Enterococcus faecalis* (tableau 12) ; l'isolat I₁₄ a montré une résistance presque à tous les antibiotiques testés ; Chloramphenicol, Cefotaxime, Oxacilline, Piperacilline, Sulfamethoxazole, Tétracycline et Ticarcylone avec des diamètres d'inhibitions de 8, 6, 6, 6, 26, 16 et 6 mm respectivement, contrairement à l'isolat I₁₂ qui est résistante seulement la Cefotaxime et la Tétracycline avec des diamètres d'inhibitions de 6 et 8 mm respectivement (fig 41).

Tableau n°12. Résultats de l'antibiogramme de *Enterococcus faecalis*.

Antibiotique	Diamètre critique (mm)			I ₁₄		I ₁₂	
	R	I	S	Ø (mm)	Résultat	Ø (mm)	Résultat
Chloramphenicol	≤19	20-22	≥23	8	R	30	S
Cefalexine	≤16	-	≥16	22	S	20	S
Cefotaxime	≤23	24-25	≥26	6	R	6	R
Oxacilline	≤8	9-13	≥14	6	R	16	S
Piperacilline	≤18	-	≥18	6	R	18	S
Sulfamethoxazole	≤26	27-33	≥34	26	R	26	S
Tetracycline	≤17	18	≥19	16	R	8	R
Ticarcilline	≤23	-	≥23	6	R	25	S

Concernant le test de l'antifongigramme, l'antifongique utilisé (Econazole 1%), s'est avéré actif sur le *Candida albicans* (tableau 13), dont le diamètre d'inhibition été de 53 et 46 mm pour les deux isolats I₅ et I₆ respectivement (fig. 42). Cette activité a été prouvée aussi dans les travaux de **Abdelli (2017)** avec un diamètre de 19,33 mm.

Tableau n°13. Résultats de l'antibiogramme de *Candida albicans*.

Antifongique	Diamètre critique (mm)			I ₅		I ₆	
	R		S	Ø (mm)	Résultat	Ø (mm)	Résultat
Fluconazole	≤		≥	53	Sensible	46	Sensible

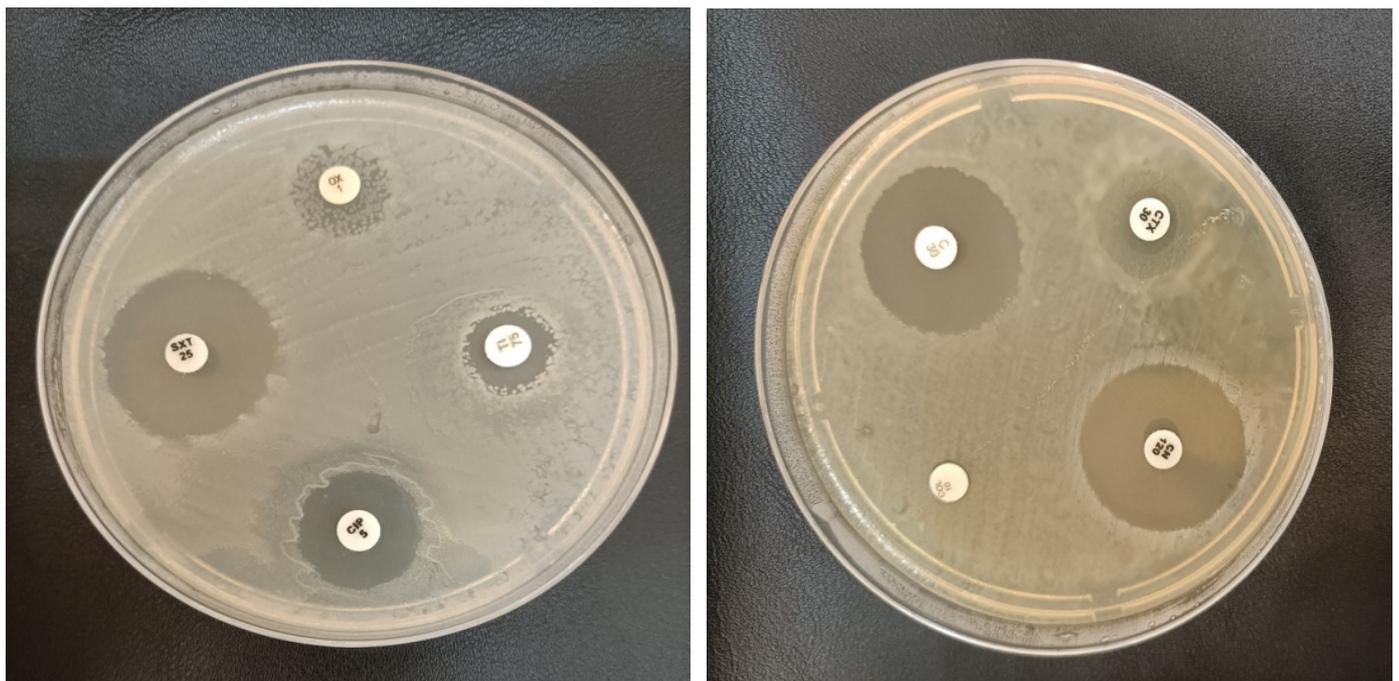


Figure n° 37. Antibiogramme de *E. coli*.

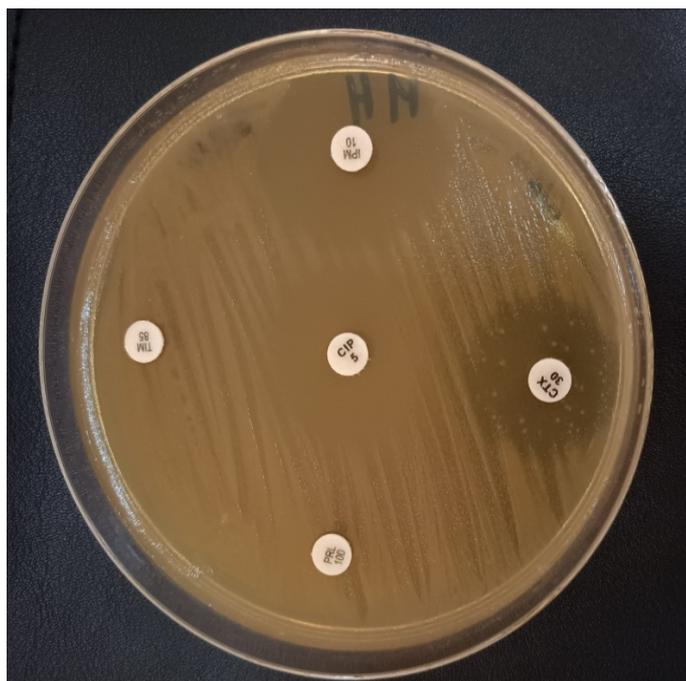


Figure n° 38. Antibiogramme de *Shigella dysenteriae*.



Figure n° 39. Antibiogramme de *Pseudomonas aeruginosa*.

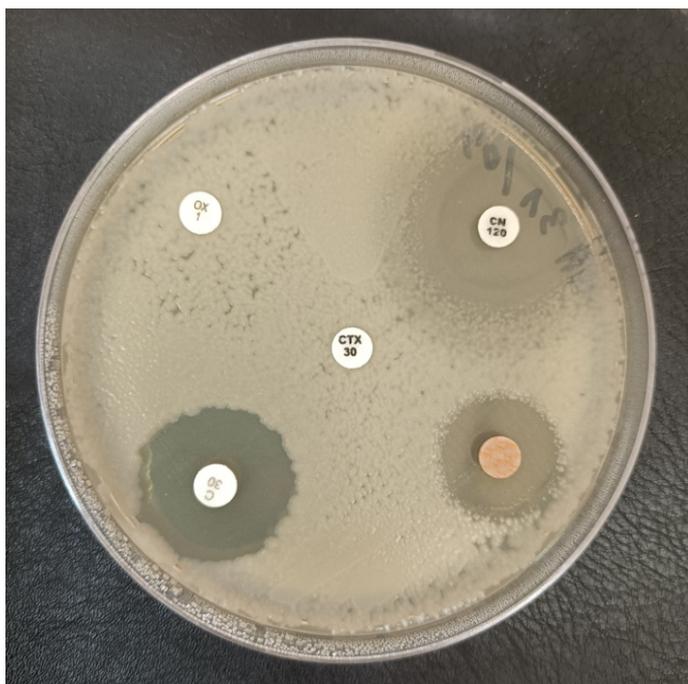


Figure n° 40. Antibiogramme de *Staphylococcus aureus*.

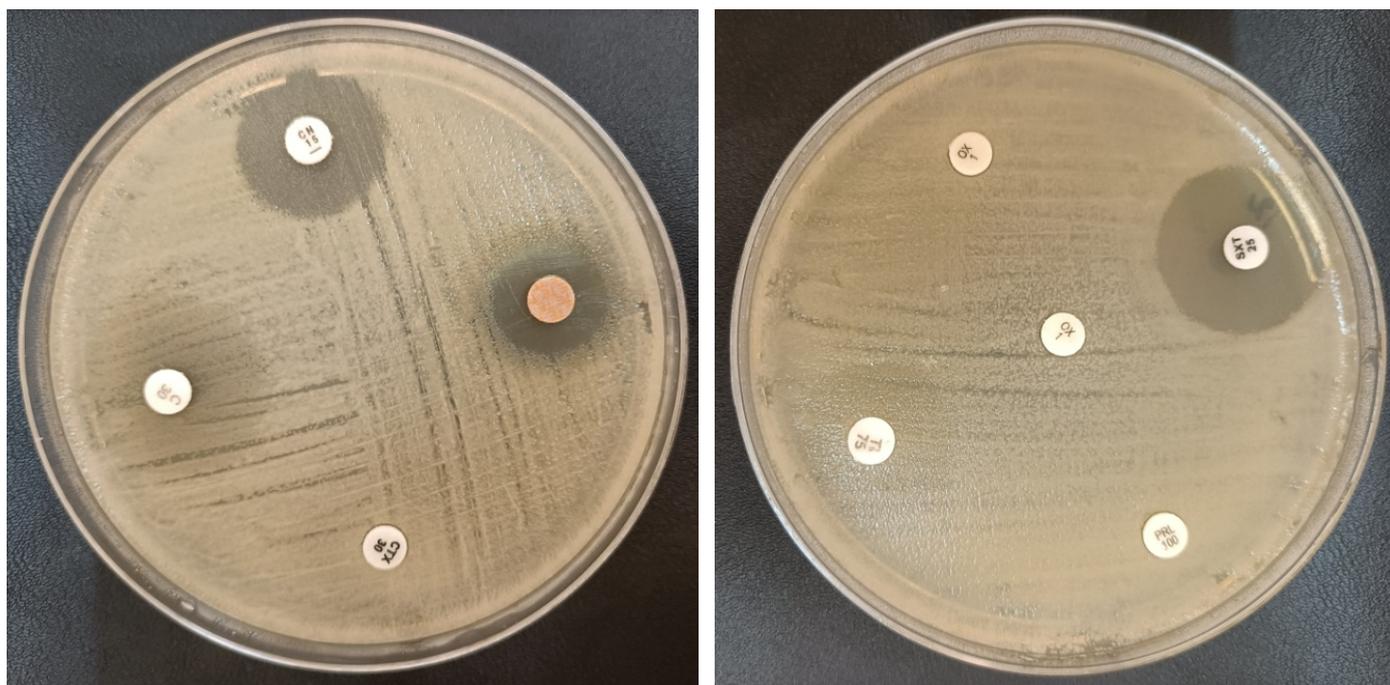


Figure n° 41. Antibiogramme de *Enterococcus faecalis*.

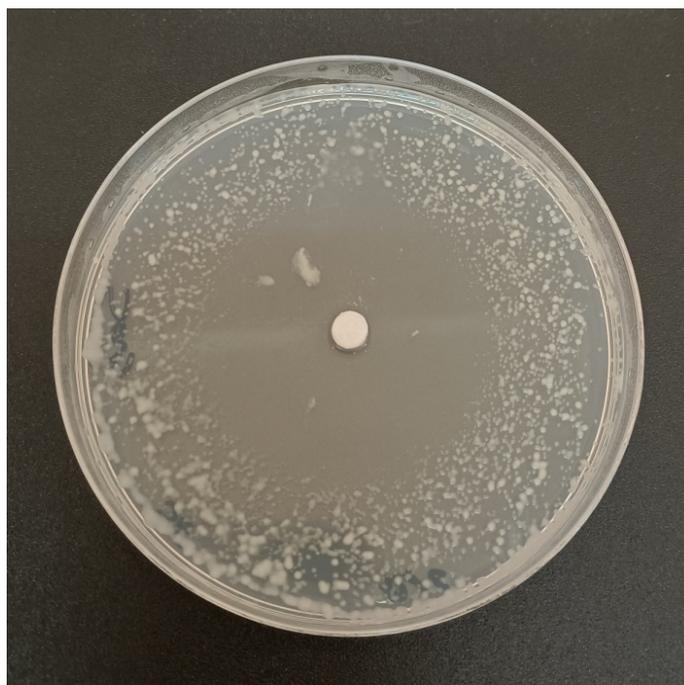


Figure n° 42. Antibiogramme de *Candida albicans*.

Les résultats de l'antibiogramme et l'antifongigramme ont montré une résistance acquise et multiple à 10 bactéries parmi 18 isolats, qui nous a poussé de chercher une alternative naturelle pour limiter cette résistance croissante.

V.3. Activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Artemisia herba alba* vis-à-vis des microorganismes testés

V.3.1. Extraction des huiles essentielles de *Artemisia herba alba*

Après l'hydrodistillation de *Artemisia herba alba* (fig.43) à partir de 500 g de matière végétale pendant 2 heures, nous avons obtenu les quantités des huiles essentielles indiquées dans le tableau 14, ce qui nous a permis de calculer le rendement d'extraction (R_{HE}).

$$R_{HE1} = \frac{3.913}{500} \times 100 = 0.78\%$$

$$R_{HE2} = \frac{3.360}{400} \times 100 = 0.84\%$$

$$R_{HE3} = \frac{4.150}{500} \times 100 = 0.83\%$$

$$R_{HEm} = \frac{R_{HE1} + R_{HE2} + R_{HE3}}{3} = 0.81\%$$



Figure n° 43. Extraction des huiles essentielles de *Artemisia herba alba* par entraînement à la vapeur d'eau.

Tableau n° 14. Rendement d'extraction des huiles essentielles de *Artemisia herba alba* par entraînement à la vapeur d'eau.

Essais N°	Masse du matériel végétal (en g)	Eau distillée en ml	Masse des HEs (en g)	Rendement (R _{HE} %)	Rendement moyen (R _{HEm} %)
01	500	2500	3,913	0.78%	0.81%
02	400	2500	3.360	0.84%	
03	500	2500	4.150	0.83%	

Le rendement moyen de l'extraction des huiles essentielles de *Artemisia herba alba*, était de 0.81%. Cette valeur est presque la même obtenue par **Lakehal et al. (2017)**. Contrairement, notre rendement est un peu plus faible à celui qui est obtenu par **Ghanmi et al. (2010)** qui de (0,86 ± 0,06 %). En outre, les travaux réalisés par **Touil et Benrebiha (2014)** montre que le rendement est inférieur (0,7%).

Cette différence laisse penser que le rendement des huiles essentielles de *Artemisia herba alba* due à plusieurs facteurs ; l'origine géographique de la plante, les facteurs écologiques notamment climatiques (la température et l'humidité), l'espèce et/ou la variété végétale elle-même, l'organe végétal, le stade de la croissance, la période de cueillette ainsi que la méthode d'extraction (**Tefiani, 2015**).

V.3.2. Activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Artemisia herba alba* face aux isolats microbiens étudiés

V.3.2.1. Aromatogramme

Ces dernières années, il a été ciblé l'intérêt pour les molécules biologiquement actives, isolées des espèces végétales pour éradiquer les microorganismes pathogènes (**Essawi et Srour, 2000**).

Le diamètre de la zone autour du disque traduisant l'activité antimicrobienne, a été mesuré à l'aide d'un pied à coulisse. La sensibilité des bactéries testées aux huiles essentielles est classée selon les diamètres d'inhibition : bactéries résistantes ($\emptyset \leq 8$ mm), bactéries sensibles ($9 \text{ mm} \leq \emptyset \leq 14$ mm), bactéries très sensibles ($15 \text{ mm} \leq \emptyset \leq 19$ mm) et bactéries extrêmement sensibles ($\emptyset \geq 20$ mm) (**Ponce et al., 2003**).

Suite aux résultats indiquées dans le tableau (15) et la figure 44, les huiles essentielles de *Artemisia herba alba* ont montré bien l'activité antimicrobienne contre les bactéries à coloration Gram positive et les bactéries à coloration de Gram négative.

Dans le cas des bactéries à coloration de Gram négative, les isolats (I₁ et I₁₇) de *E. coli* et (I₂₁ et I₂₂) de *Shigella dysenteriae*, ont la même sensibilité avec des diamètres d'inhibition de 12, 12, 12 et 13 mm respectivement (fig. 45 et 46).

Cette activité a été exercée aussi contre *Pseudomonas aeruginosa* dont le diamètre de la zone d'inhibition été de 14 mm (fig. 47).

Pour les bactéries à coloration de Gram positive, les plus grandes zones d'inhibition ont été obtenues chez les 4 isolats I₃, I₇, I₈, et I₁₁ de *Staphylococcus aureus* et I₁₄ de *Enterococcus faecalis* avec les diamètres d'inhibitions de 17, 19, 18, 19 et 16 mm respectivement (fig. 48, 49).

Tableau n° 15. Résultats de l'aromatogramme des huiles essentielles de *Artemisia herba alba* sur les souches microbiennes étudiées.

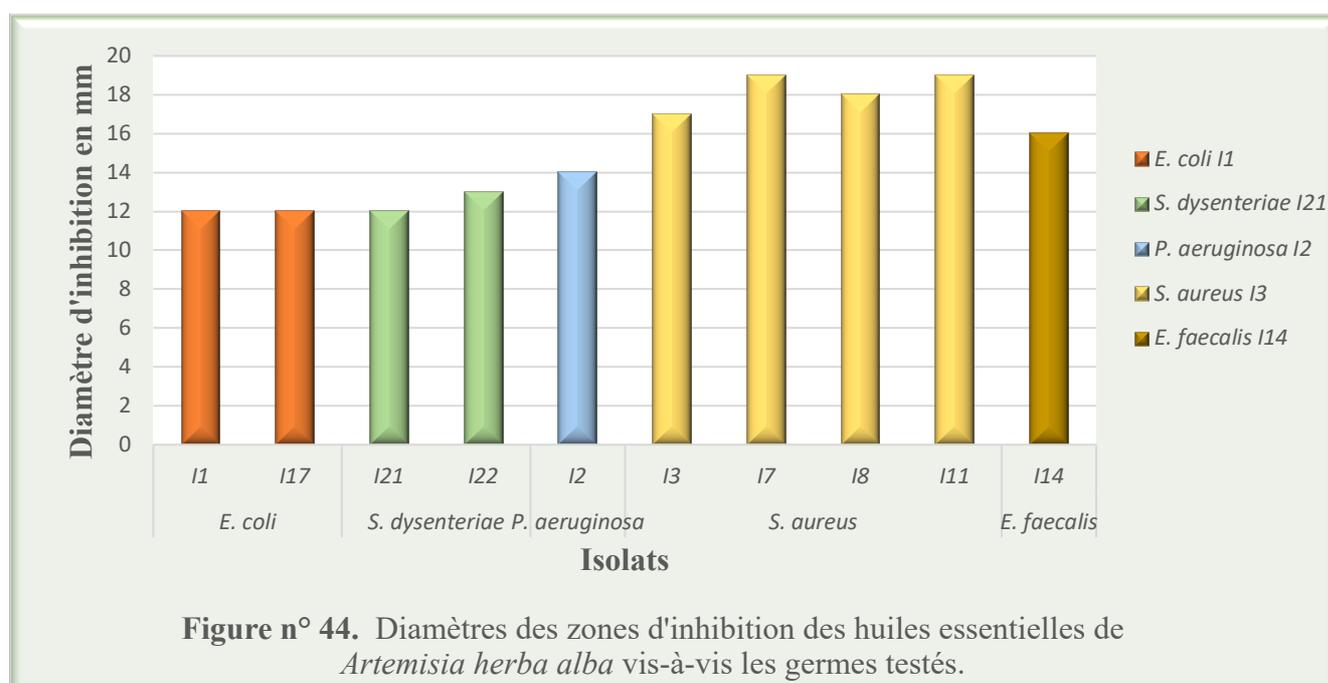
Bactérie		Diamètre critique				Résultats	Sensibilité				
<i>E. coli</i>	I ₁	R	S	T.S	E.S	12	S				
	I ₁₇					12	S				
<i>Shigella dysenteriae</i>	I ₂₁					12	S				
	I ₂₂					13	S				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	I ₂					Ø ≤ 8	9 ≤ Ø ≤ 14	15 ≤ Ø ≤ 19	Ø ≥ 20	14	S
<i>Staphylococcus aureus</i>	I ₃									17	T.S
	I ₇									19	T.S
	I ₈									18	T.S
	I ₁₁									19	T.S
<i>Enterococcus faecalis</i>	I ₁₄					16	T.S				

R : Résistant

S : Sensible

T.S : Très sensible.

E.S : Extrêmement sensible



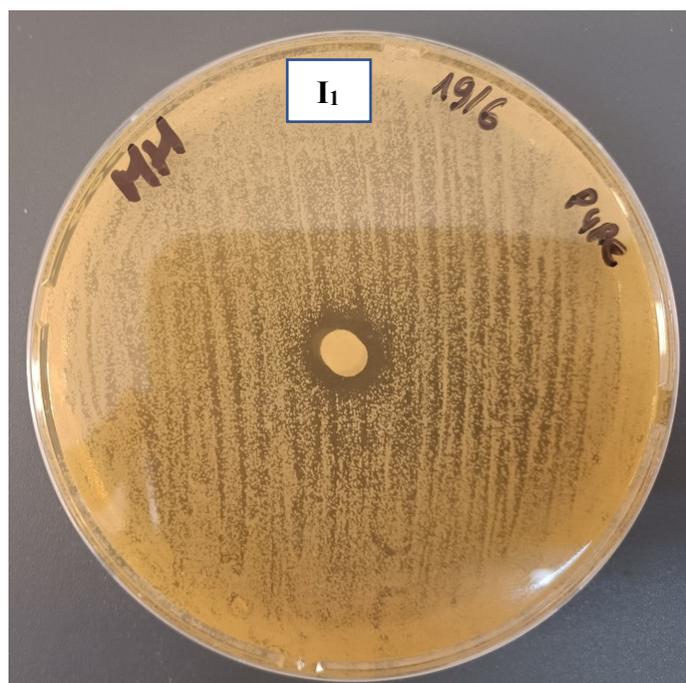


Figure n° 45. Aromatogramme de *E. coli* par l'huile essentielle de *Artemisia herba alba*.

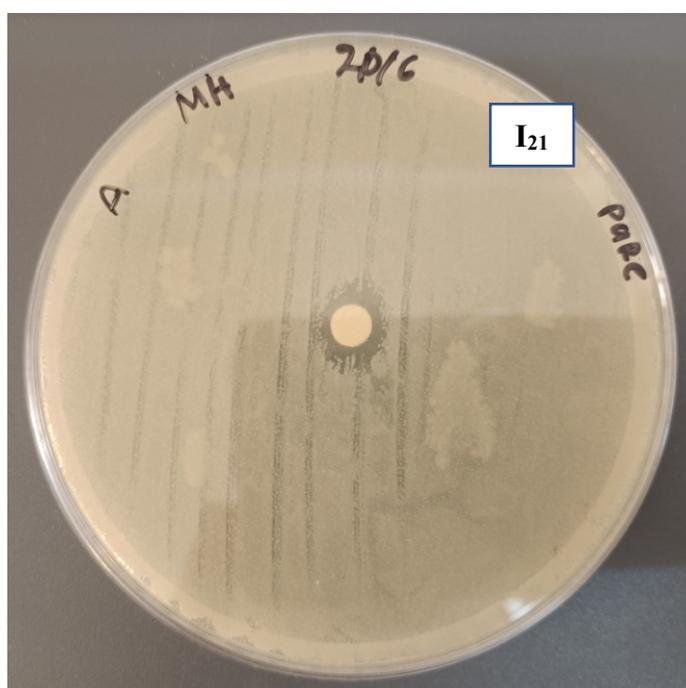


Figure n° 46. Aromatogramme de *Shigella dysenteriae* par l'huile essentielle de *Artemisia herba alba*.

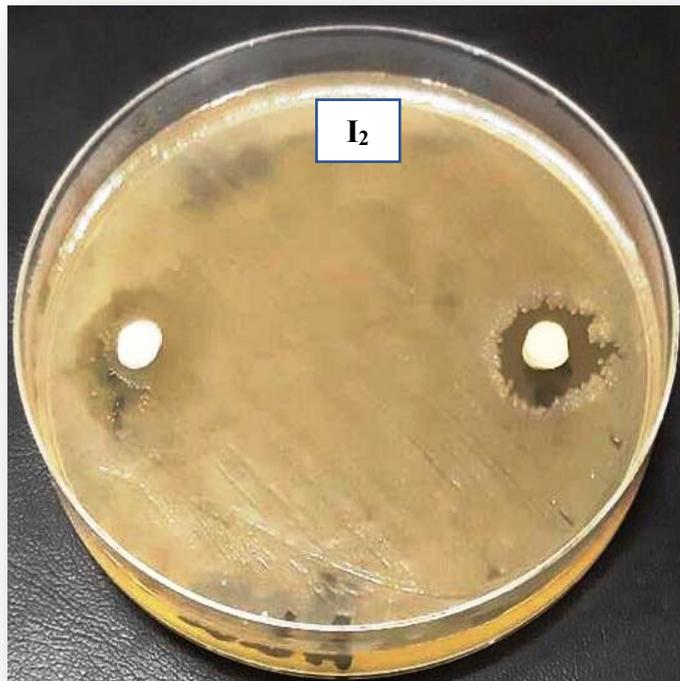


Figure n° 47. Aromatogramme de *Pseudomonas aeruginosa* par les huiles essentielles de *Artemisia herba alba*.

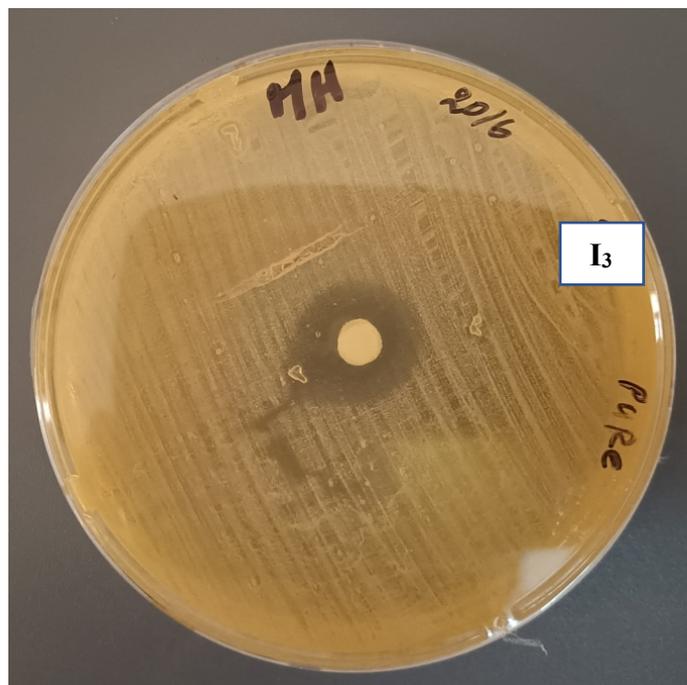


Figure n° 48. Aromatogramme de *Staphylococcus aureus* par l'huile essentielle de *Artemisia herba alba*.

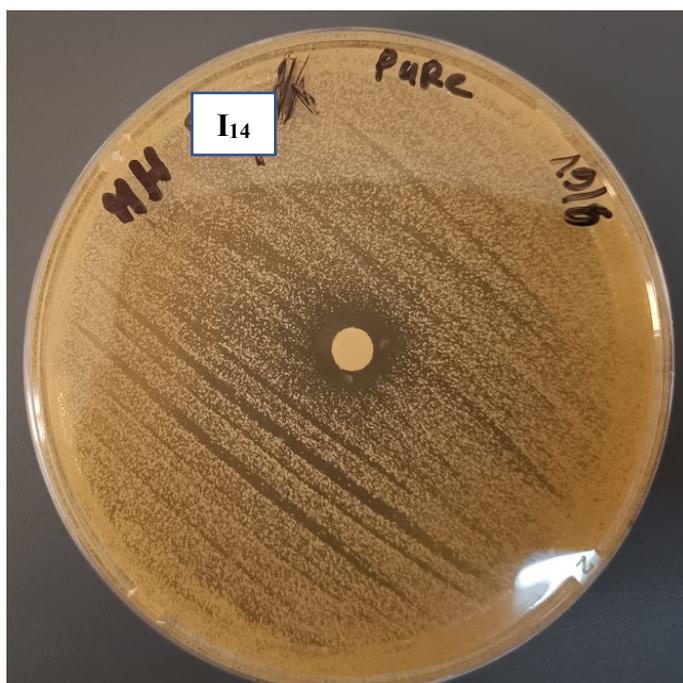


Figure n° 49. Aromatogramme de *Enterococcus faecalis* par l'huile essentielle de *Artemisia herba alba*.

La valeur du diamètre de la zone d'inhibition de *Escherichia coli* est proche à celle obtenue par **Ed-Dar (2021)** de 14 mm, pour la souche *E. coli* ATCC 35218. Cela est prouvé aussi par les travaux de **Lakehal et al. (2017)** avec un diamètre moyen de 19.00 ± 0.55 contre *E. coli* ATCC125922.

Par contre les travaux de **Bertella (2019)** qui a utilisé les huiles essentielles pures de *Artemisia herba alba*, montre des résultats largement supérieurs aux nos résultats vis-à-vis des souches bactériennes à Gram+ (*Staphylococcus aureus*) avec des diamètres qui varient entre 39 à 41 mm.

Pour *Pseudomonas aeruginosa*, les mêmes valeurs des zones d'inhibition ont été trouvées par **Heleili et al. (2018)** autour de 12,52 mm.

De leurs côtés aussi, **Bertella et al. (2018)** ont constaté une moindre efficacité des huiles essentielles de *Artemisia herba alba* vis-à-vis des bactéries à coloration de Gram positive avec des diamètres des zones d'inhibition qui varient entre 10,6 et 28,3 mm par rapport aux bactéries à coloration de Gram négative avec des diamètres des zones d'inhibition compris entre 8 et 31,3 mm.

Les résultats de l'aromatogramme obtenus, nous a conduits à confirmer quantitativement l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Artemisia herba alba* sur 10 isolats étudiés.

V.3.2.2. Détermination de la CMI des huiles essentielles de *Artemisia herba alba* vis-à-vis les isolats testés en milieu solide

La concentration minimale inhibitrice (CMI) a été définie comme la plus faible concentration des échantillons testés où l'absence de croissance a été enregistrée (**Ponce *et al*, 2003**).

Le tableau 16, l'histogramme (fig. 50), sont consignés les résultats des CMI (en $\mu\text{g/ml}$) des huiles essentielles de *Artemisia herba alba*.

Tableau n° 16. Résultats de la CMI des huiles essentielles de *Artemisia herba alba* vis-à-vis les souches microbiennes étudiées.

Bactérie		Concentration des HEs de <i>Artemisia herba alba</i> en $\mu\text{l/ml}$ (v/v)								Témoin
		Tube : 1	2	3	4	5	6	7	8	
		10	5	2,5	1,25	0,625	0,3125	0,15625	0,078125	
<i>E. coli</i>	I ₁	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	I ₁₇	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Shigella dysenteriae</i>	I ₂₁	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	I ₂₂	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	I ₂	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	I ₃	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	I ₇	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	I ₈	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	I ₁₁	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	I ₁₄	-	-	-	-	-	+	+	+	+

Globalement, nous constatons que les valeurs de la CMI des huiles essentielles de *Artemisia herba alba* varient de 0,31 - 10 $\mu\text{l/ml}$ (v/v) (fig. 51, 52).

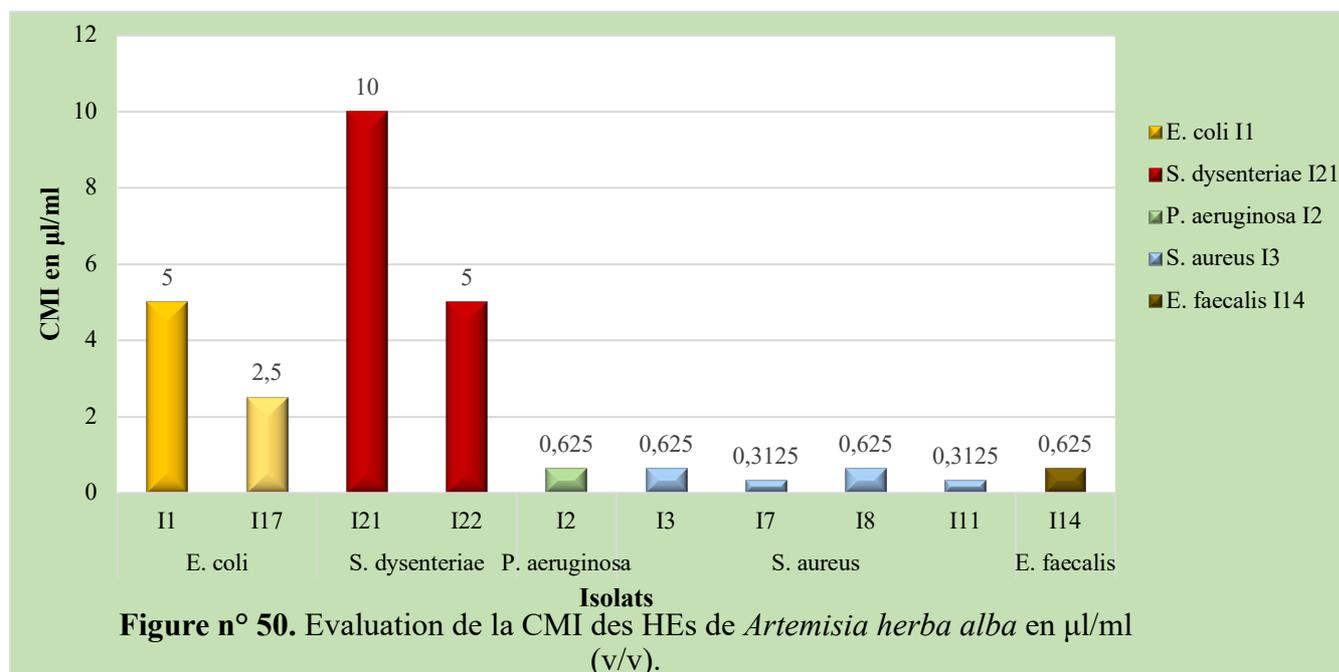
À la lecture des résultats obtenus on remarque que les HEs de *Artemisia herba alba* ont présentées une bonne activité antibactérienne sur *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis*. Alors que *E. coli*, *Shigella dysenteriae* et *Pseudomonas aeruginosa*, leur sensibilité reste faible : on note une activité antibactérienne plus prononcée sur les bactéries à coloration de Gram positive que les bactéries à coloration Gram négative. Ces résultats sont en accord

avec ceux trouvés par **Ed-Dar (2021)**, où les valeurs de la CMI étaient de 0,625 µg/ml et 0,156 µg/ml pour les bactéries ; *E. coli* ATCC 25922 et *S. aureus* respectivement.

Cette différence de sensibilité observée entre les isolats testés pourrait s'expliquer par la mince paroi cellulaire peptidoglycane qui est elle-même entourée d'une membrane externe contenant un lipopolysaccharide qui crée une barrière contre les composés hydrophobes tels que ceux trouvés dans les huiles essentielles, tandis que les bactéries à coloration de Gram-positive ne présentent pas une membrane externe mais sont entourées par des couches de peptidoglycane, plus épaisses que ce qui se trouve chez les bactéries à coloration de Gram-négative (**Silhavy et al., 2010**).

Koutsoudaki et al. (2005) et **Burt (2004)** ont signalé que les extraits végétaux sont plus actifs contre les bactéries à coloration de Gram-positive que les bactéries à coloration de Gram-négative.

Par ailleurs, **Ghanmi et al. (2010)** ont également montré une activité antimicrobienne des huiles essentielles issues des échantillons de l'armoise blanche des trois périodes de récoltes se sont montrées actives contre toutes les souches de bactéries et de moisissures testées, mais c'est celle du mois de septembre qui a manifesté la plus grande efficacité antimicrobienne.



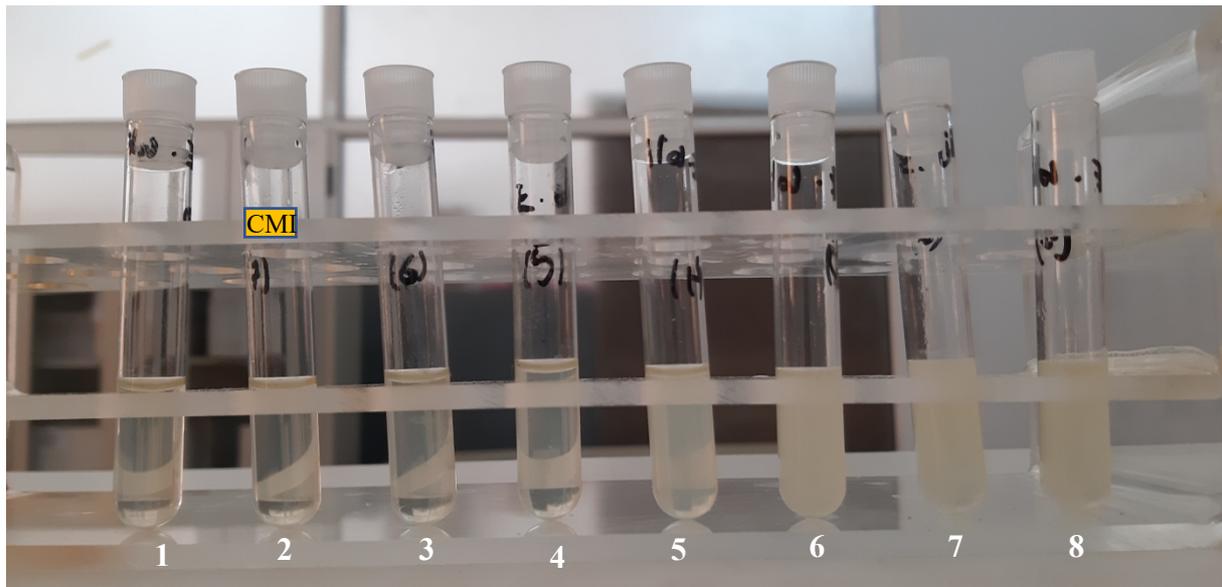


Figure n° 51. Concentration minimale inhibitrice des huiles essentielles de *Artemisia herba alba*. Vis-à-vis *E. coli*.

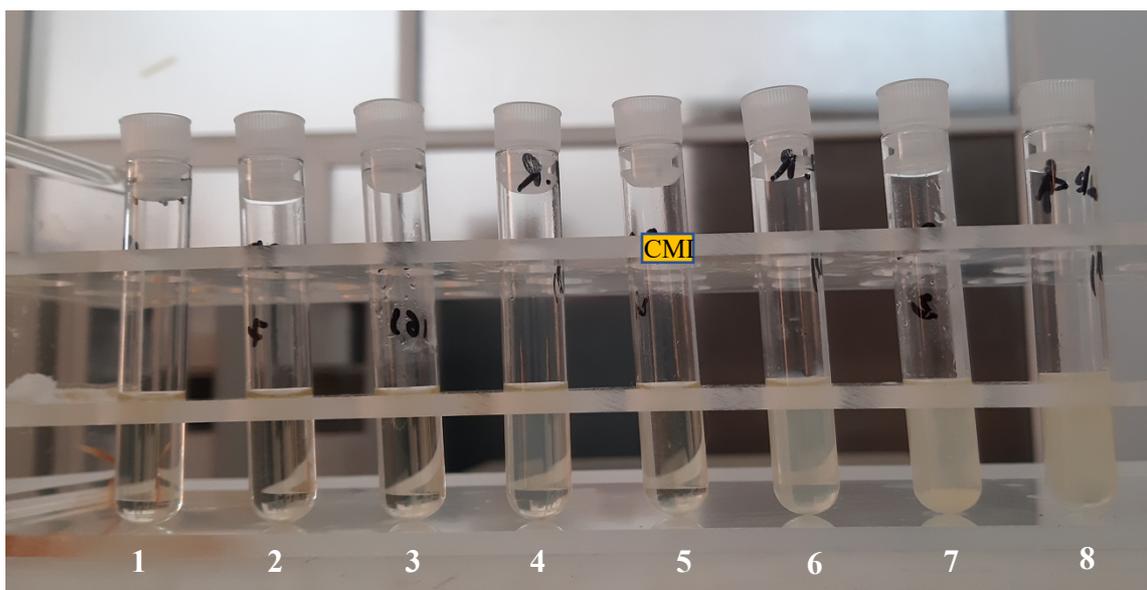


Figure n° 52. Concentration minimale inhibitrice des huiles essentielles de *Artemisia herba alba*. Vis-à-vis *S. aureus*.

Conclusion

Conclusion

Les huiles essentielles sont connues pour être douées de propriétés antiseptiques et antimicrobiennes.

Le présent travail a été mené dans le cadre de la valorisation de la flore algérienne et plus particulièrement ; *Artemisia herba alba* poussant à l'état spontané dans les zones semi-arides de l'Algérie, on extrait leurs huiles essentielles et en évaluant leur activité antimicrobienne.

L'aromathérapie explique que le traitement des maladies (thérapie) par les arômes (essences ou huiles essentielles de plantes aromatiques). Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés par l'exploitation de la plante de *Artemisia herba alba*, dont on a extrait ces huiles essentielles par entraînement à la vapeur d'eau. L'extraction a donné un rendement en HEs de 0.81%.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a permis de montrer par la méthode d'aromatogramme, un grand effet inhibiteur des huiles essentielles de *Artemisia herba alba* sur les huit isolats testés. Les plus sensibles sont les isolats de *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis*. La plus grande zone d'inhibition a été enregistrée à un diamètre de 19 mm.

La méthode de macrodilution en milieu liquide a permis d'obtenir les concentrations minimales inhibitrice (CMI), à des valeurs allant de 0.312 à 10 µl/ml.

Les performances antimicrobiennes mises en évidence méritent d'être étudiées avec plus de détails afin d'envisager des perspectives pour de cette essence :

- Identifier des composés responsables des différentes activités,
- Élargissant la gamme des microorganismes testés,
- Étudiant les mécanismes d'action de ces huiles essentielles.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- ❖ **Abad M. J., Bedoya I. m., Apoza L., et Bermejo P.** 2012. he Artemisia L.Genus : A review of bioactive Essentielle oils. Journal of Molécule, **17**, p : 2542-2566.
- ❖ **Abboud A. S. et Waheed H. k.** 2017 . l'importance des plantes médicinale et leur utilisation dans les anciens civilisation. revue de littérature. P : 377- 392.
- ❖ **Abdelli.** 2017. Caractérisation chimique et étude de quelques activités biologiques des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea* et de *Thymus vulgaris*. Thèse de Doctorat, Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem, Algérie. p : 214.
- ❖ **Abdoune M. A.** 2017. Les huiles essentielles : pour votre santé et votre beauté partie 2. francemaison de taktime. p : 29-31.
- ❖ **Abou Arqoub, M. M.** 2002. Les antibiotiques et trois résistances. Egypte : bibliothèque académique pour l'édition. P : 716.
- ❖ **Ahmad M. et Rehman S.** 2006. Sensory evaluation of citrus peel essential oils asflavouring agentsin various food products. J.Agric.Res. **44**, p : 325-333.
- ❖ **Ahmed A.A, Abou-El-Ela M, Jakupovic J, Seif El-Din A, A, et Sabri N.** 1990. Eudesmanolides and other constituents from *Artemisia herba-alba*, Phytochemistry **29** (11), p : 3661-3663.
- ❖ **Ahmed I., Owais M., Aqil F. et Shahin M. S.** 2010. Combating Fungal and Remedy. London. edition Springer science and busnies mdia. P : 539.
- ❖ **Aidoud A.** 1988. Les écosystèmes steppiques à armoise blanche (*Artemisia herba-alba Asso*) : Caractères généraux. Biocénose : Bulletin d'écologie terrestre, CRBT. Alger, Tome 3N° p : 12.
- ❖ **Al sanafi, A. I.** 2010. Antimicrobial drugs. Iraq université de Dhi qar. P : 149.
- ❖ **Al-mousili D.** 2018. Les plantes vénéneuses et l'utilisation de leurs composants dans les médicaments . leban maison des livres scientifique. p : 416.
- ❖ **Almordjani, M. F.** 2011. Antibiotiques : la résistance bactérienne aux l'antibiotiques. iraqe: dar aldadjla. P : 330.
- ❖ **Alnuaimi, S. A. N.** 2020. Le sol et le berceau de la médecine lébandar. *Alkotob alislamia*. P : 330.
- ❖ **Aouadhi S.** 2010. Atlas des risques de la phytothérapie traditionnelle : Etude de 57 plantes recommandées par les herboristes. Master en toxicologie, Faculté de médecine de Tunis. P : 71.
- ❖ **Arabi A.** 2018. Effet antimicrobien des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus* L. sur quelques espèces bactériennes multirésistantes de la microflore digestive humaine. Thèse de Doctorat, Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem, Algérie. p : 181.
- ❖ **Astier-Théfennea H., Wolfa A., Darlesa C. et Garnotela E.** 2014. Vérification des

Références bibliographiques

- performances d'une méthode selon le SH FORM 44 : application à la coloration de Gram. Revue Francophone des Laboratoires Elsevier Masson SAS. (461), p : 37-46.
- ❖ **Aubin G., Caron F., Cattoir V., Dubreuil L., Goutelle S., Jeannot K., Lepeule R., Gérard L., Marchandin H., Merens A., Ploy M.C., Schramm F. et Varon E.** 2021 CASFM : comité de l'antibiogramme de la société Française de Microbiologie. P : 188.
 - ✚ **Avril J.L., Dabernat H., Denis F. & Monteil H.** 2000. Bactériologie clinique. Ellipses 2^{ème} édition, Paris, France, P : 602.
 - ❖ **Ayad N, Djennane A, Ayache H et Hellal B.** 2013. Contribution à l'étude de l'implantation de l'armoise blanche « *Artemisia herba alba Asso* » dans la steppe du sud de Tlemcen. Revue Ecologie- Environnement.
 - ❖ **Baba A. F.** 2000. Encyclopédie des plantes utiles : Flore d'Algérie et du Maghreb, Université hassiba benbouali, Chlef, Algérie. p : 368.
 - ❖ **Baby P. S. et Samuel M.** 2007. Aromatic plants. Indian. edition India publishing agency. p : 290.
 - ❖ **Bailey C. et Danin A.** 1981. Bedouin plant utilization in Sinai and Negev. Econ. Bot., **35**. p : 145-162.
 - ❖ **Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D. et Idaomar M.** 2008. Biological effects of essential oils : areview. Food Chem. Toxicol. **46**, p : 446-475.
 - ❖ **Bardeau F.** 2009. les huiles essentielles : découvrir les bienfaits et les vertus d'une médecine ancestrale. France : LANORE. P : 315.
 - ❖ **Bekada J.** 2019. Intérêt des tests microbiologiques dans le cas de la Gastrite B, maladie de Crohn et Rectocolite hémorragique. Thèse de Doctorat, Université Oran I, Algérie. p : 176.
 - ❖ **Bellakhdar J.** 1997. la pharmacopée marocaine traditionnelle, médecine arabe ancienne et savoirs populaires . France: Ibis press paris. P : 326.
 - ❖ **Bendjilalib, Richard H. et Liddle P.** 1984. Chémotypes d'armoise blanche du BEN-HAYYIM G., VAADIA Y. et WILLIA B. G., Proteins associated with salt adaptation in citrus and tomato cells : Involvement of 26 KD polypeptides, Physiol Plant. **77**: p : 332–340.
 - ✚ **Bertella A.** 2019. Etude de l'activité antimicrobienne et antioxydante des huiles essentielles de *Artemisia hrba alba*, *Artemisia comprestris* et *Rosmarinus tounefortii*. These de doctortat, Université d'Oran, Algerie. P: 139.
 - ❖ **Bertella A.** 2020. Étude de l'activité antimicrobienne et antioxydante des huiles essentielles *d'Artemisia herba alba*, *Artemisia campestris* et *Rosmarinus tournefortii*. Thèse de Doctorat, Université d'Oran, Algérie. p : 169.
 - ✚ **Bertella A., Benlahcen k., Abouamama S., Pinto D.C.G.A., Maamar k., Mebrouk K., Silva A.M.S.** 2018. *Artemisia herba-alba Asso*. essential oil antibacterial activity and acute toxicity. Industrial Crops & Products, 116, p: 137–143.
 - ❖ **Beylier-Manuel M.F.** 1976, *Rivista Italiana*, E.P.P.O.S ; (**58**) p : 283 - 286.

Références bibliographiques

- ❖ **Bezza L., Mannarino A., Fattarsi K., Mikail C., Abou L., Hadji-Minaglou F. et Kaloustian J.** 2010. Composition chimique de l'huile essentielle d'*Artemisia herba-alba* provenant de la région de Biskra, Algérie, *Phytothérapie*, **8**, p : 277–281.
- ❖ **Blosos, J., A Mason, K., et All.** 2014. *Biologie*. Arabie saoudit : Obeikan d'édition. p :1378.
- ❖ **Boriky D., Berrada M., Talbi M., Keravls G. et Rouessac F.** 1996. Eudesmanolides from *Artemisia herba-alba*, *Phytochemistry*, **43** (1) : p : 309-311.
- ❖ **Boukhate M. N., Ferhat A. K. et Abdelkarim.** 2019. Méthode d'extraction et de distillation des huiles essentielles. *revue Agrobiologie*. 1653- 1659, p : 1657.
- ❖ **Boulevard R.** 2006. Etude de la sensibilité des levures du genre *Candida* aux antifongiques de la famille des Azoles (Fluconazole, Voriconazole). Fiche technique. Bio-Rad Marnes-la-Coquette. France. p : 3.
- ❖ **Bourass B.** 2010. Mise en évidence d'une relation entre la biomasse aérienne (biomasse totale, biomasse aérienne des feuilles et pousses tendres) et certains caractères mesurables de l'Armoise blanche (*Artemisia herba-alba*) sur les parcours de Talsint, Mémoire de fin d'études E.N.A, université moulay ismail, maroc. p : 133.
- ❖ **Bousbia N.** 2011. Extraction des huiles essentielles riche en ant-oxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaire. These en co-tutelle , Ecole nationale supérieure agronomique ,Alger , Algerie . P : 176.
- ❖ **Boussena S.** 2020. Manuel des travaux pratique de bactériologie. Université Des Frères Mentouri I constantine, Algérie. p : 64.
- ❖ **Bouzouita N., Kachouri F., kamel Ben Halima, M. et Chaabaabouni, M. M.** 2008. composition chimiqueet activité antioxydants ,antimicrobienne et insecticide de huiles essentielle de *Juniperus phoenicea*. *Journale de la societé chimique de tunisie*. **10** , p : 119-125.
- ❖ **Bruneton J.** 2008. Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales. 2^{eme} éd, Paris, Tec & Doc, Éditions médicales internationales. p : 1188.
- ❖ **Bruneton J.** 2009. Pharmacogonosie-phytochimie, plantes médicinales. 4^oedition. France: Edition médicale internationale Tec & Doc lavoisier. P : 1268.
- ❖ **Burt S.** 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods : a review. *Int. J. Food Microbiol.*, **94**, p : 223-253.
- ❖ **Celles J C.,** 1980, - *Biologie et écologie végétales des régions arides* Université de Nice, p : 1-20.
- ❖ **Chenni M. et El abed d.** 2017. Procédes d'extraction des produits bioactifs. *Phyto chem & bio Sub Journal*. **11** (1), p : 02- 29.

Références bibliographiques

- ❖ **Chouitah O.** 2012. Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles des feuilles de *Glycyrrhiz aglabra*. Thèse de doctorat. Université d'Oran 1 Ahmed Ben Bella, Algérie. p : 143.
- ❖ **Dahmani N.** 2004. Extraction et analyse d'huiles essentielles d'armoise algérienne (*Artemisia herba alba*). Mémoire de magister, université USTHB-Alger. Algérie, p : 132.
- ✚ **Denis F., Poly M.C., Martine C., Cattor V.** 2016. Bacteriologie médicale : Techniques usuelles. Edition Elsevier science health. P : 600.
- ❖ **Diane C.** 2020. Profile microbiologique des infections d'ascite diagnostique au CHU de Rabat. Thèse de Doctorat en pharmacie, Université Mohamed V, Rabat, Maroc. p : 132.
- ❖ **Dorman H. J. D. et Deans S. G.** 2000. Antimicrobial agents from plants : antibacterial activity of plant volatile oils. J. App. Microbiol. **88**, p : 308-316.
- ❖ **Doublet B., Bousquet A., Madec J.** 2012. Le concept "one Health" en antibiorésistance et les flux de gènes. Innovations agronomiques, 79- 90.
- ❖ **Dumartin K.** 2019. L'antibiorésistance, un risque maîtrisable ? le point en 2019. Journées pharmaceutiques international de paris 70es JPIP. France : Université Bordeaux. P : 29.
- ✚ **ED-dra A., Rhazi Filali z., Lopresti V., Zekkori B., Nalbone L.E., Elsharkawy M.R., Bentayeb A., Giarratan F.** 2021. Effectiveness of essential oil from the *Artemisia herba-alba* aerial parts against multidrug-resistant bacteria isolated from food and hospitalized patients. Biodiversitas, Vol 22 (7), p : 2995-3005.
- ❖ **El Hip A.** 2011. Valorisation de terpènes naturels issus de plantes marocaines par transformations catalytiques, Thèse de doctorat, Université de Toulouse III, France, p : 193.
- ❖ **Emaleu, S. B.** 2017. Prévention des infections en milieu hospitalier. France : éditions publibook. P : 248.
- ❖ **Émilie, C. M., Oana. D., Philippe. L.** 2019. La résistance aux antibiotiques. Plant-Vie. La santé publique France : <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/infections-associees-aux-soins-et-resistance-aux-antibiotiques/resistance-aux-antibiotiques>
- ✚ **Essawi T et Srour M.** 2000. Screening of some Palestinian medical plantes for antibacterial activity. Journal of Ethano-pharmacologie N 70. P : 343-349.
- ❖ **Ferchichi A., Chaieb C. et Ferjani E.** 2004. Caractérisation de la variabilité du comportement phytologique de certaines populations d'*Artemisia herba-alba* du sud Tunisien. CIHEAM-IAMZ. P : 489.
- ❖ **Ferhat M. A.** 2007. Extraction sans solvant assistée par micro-ondes des huiles essentielles des citrus d'algerie: compréhension, application et valorisation. université de science et de la technologie algérie , algérie . p : 150.

Références bibliographiques

- ❖ **Floret C. et Potanier R.** 1982. Aridité en Tunisie présaharienne, Climat, sol, végétation et aménagement, Travaux et documents de l'Orstom. Edition de l'office de la recherche scientifique et technique outre-mer, Paris. p : 543

- ❖ **Gad H. A.** 2011. La géographie du monde arab. égypte: la maison libanaise égyptienne. P : 391.

- ✚ **Ghanmi M., Satrani B., Aafi A, Isamili M.R., Houti H., El Monfalouti H., Benchakroun K.H., Aberchane M., Harki L., Boukir A., Chaouch A., Charrouf Z.** 2010. Effet de la date de récolte sur le rendement, la composition chimique et la bioactivité des huiles essentielles de l'armoise blanche (*Artemisia herba-alba*) de la région de Guercif (Maroc oriental). Phytothérapie 8, p : 295–301.
- ❖ **Gharabi Z. et Sand R.** 2008. *Artemisia herba-alba*, A guide to Medicinal Plants in North Africa. p : 49-49.
- ❖ **Ghrabi Z. et Al-Rowaily S.L.R.** 2005. A guide to medicinal plants in north Africa. *Artemisia herba alba Asso.* (IUCN), Spain : Malaga. p : 43-44.

- ❖ **Guinoiseau E.** 2010. molécule antibactériennes issues d'huiles essentielles: séparation identification et mode d'action. école doctorale environnement et société, Thèse doctorat, France. p : 143.

- ❖ **Hashemi Bagher S. M., Khaneghah A. M. et Sant'ana A. D.** 2018. essential oil in food processing chemistry, safety and application. India : John Wiley and son LTD. P : 392.

- ✚ **Heleili N., Merradi M., Oucheriah Y., Belkadi S., Ayachi A., Adjroud I.** 2018. Antimicrobial activity of essential oil of *Artemisia herba alba Asso* from Eastern Algeria. Journal of Biodiversity and Environmental Sciences (JBES). Vol. 12, No. 5, p : 361-366.
- ✚ **Holt G.J., Kreig N.R., Sneath P.M.A., Williams S.T.** 1994. Berg's manual of determinative bacteriology. Edition Ninth. P : 787.

- ❖ **Houamel S.** 2018. Les steppes d'armoise blanche (*Artemisia herba-alba Asso*) dans l'Est Algérien : répartition actuelle, biodiversité, dynamique et conditions de durabilité. Thèse de Doctorat, Université de Biskra, Algérie. p : 140.

- ✚ **Huc E.** 2011. O-méthylation : Caractérisation d'une nouvelle modification posttraductionnelle de petites protéines d'enveloppe chez les Corynebacterineae. Thèse de Doctorat : Université de Toulouse, P : 169.

- ❖ **Ibrahim K. H.** 2002. Traitement des maladies chroniques et incurables avec des herbes. Lebanon Mohammad Ali Beydoun publiera les livres de sunna et de la communauté. P : 128 .

- ✚ **Isnard C.** 2017. *Enterococcus* spp. : entre pathogènes opportunistes et probiotiques. Thèse de Doctorat, Université de Caen Normandie, France, p : 299.

Références bibliographiques

- ❖ **Issa A. A.** 2012. La phytothérapie entre vérité et mirage. Egypte: Maison de la république pour la presse. P : 160.
- ✚ **Kammalac, N.** 2014. Diversité génétiques d'isolats de *Cryptococcus* et *Candida* issus des patients VIH positives à Yaoundé et étude de leur sensibilité aux antifongiques et aux extraits de plantes. Thèse de doctorat : Université de Yaoundé I. p: 244.
- ✚ **Khayar Y.** 2011. Comportement des Entérobactéries isolées des Urines vis-a-vis De L'amoxicilline-Acide Clavulanique L'imipenème et L'ertapenème. Thèse de Doctorat : Université Mohammed V. Maroc, p : 149.

- ❖ **Kisk, M. W.** 2017. La résistance aux antibiotiques est une menace mondiale. Journal des sciences et de la Technologie, Numéro 249, p : 58- 63.

- ✚ **Koutsoudaki C., Krsek M., Rodger A.** 2005. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil and the gum of *Pistacia lentiscus* Var. *chia*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(20), p : 7681-7685.
- ✚ **Lakhhal S., Chaouia C. , Benrebiha F.Z.** 2017. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Artemisia herba-alba asso*. From djelfa. Revue Agrobiologia. 7(2), p : 491-501.
- ✚ **Lattab N., Kalai S., Bensoussan M., Dantingery P.** 2012. Effect of storage condition (relative humidity, duration and temperature) on the germination time of *Aspergillus Carbonarius* and *pénecillium chrysogenum*. International journal of food Microbiologie N160(1). P : 80-94.

- ❖ **Le floch E., le houero H.N. et Aidoud A.** 2006. Les steppes arides du nord de l'Afrique, Science et changements planétaires / Sécheresse, 77 (1), p : 19-30.
- ✚ **Leclercq R.** 2002. Résistance des staphylocoques aux antibiotiques. Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation, Volume 21, Issue 5, p : 375-383.

- ❖ **Malas S.** 2020. pharmacologie et plantes médicinales. dar alyazouri pour l'édition et la distribution. P : 203.

- ❖ **Mancianti F. et Ebani V. V.** 2020. Biological activité of essential oil. Molécule, 25, p : 678.

- ❖ **Mansour S.** 2015. Évaluation de l'effet anti inflammatoire de trois plantes médicinales : *Artemisia absinthium* L, *Artemisia herba alba* Asso et *Hypericum scarboides*- Etude in vivo, Thèse de Doctorat, Université Mohamed Boudiaf, Oran , Algérie. P : 121.
- ❖ **Marco J.A., Sanz-Cervera J.F., Ocete G., Carda M., Rodriquez S. et Vallès-Xirau J.** 1994. New germacranolides and eudesmanolides from north african *Artemisia herba-alba*, Journal of natural products. 57 (7), p :939-946.
- ✚ **Megraud F.** 1996. Avantages and disadvantages of current diagnostic tests for the detection of *Helicobacter pylori*. Scandinavian. Journal of Gastroenterology, 31(215). p : 57-62.

Références bibliographiques

- ❖ **Mohamed A.E.H., El-Sayed M.A., Hegazy M.E., Helaly S.E., Esmail A.M. et Mohamed N.S.** 2010. Chemical constituents and biological activities of *Artemisia herba-alba*. Records of Natural Products. **4** (1), p : 1-25.
- ❖ **Moya-salazar J. et Rojas, R.** 2018. Comparatives study for identification of *Candida albicans* with the germes tubes test in sérum of humain and plasma. Clinical microbiologie and infection diseases, **3** (3), p : 02.
- ❖ **Nabli A.** 1989. Essai de synthèse sur la végétation et la phyto-écologie tunisienne, Programme flore et végétations tunisiennes. p : 193.
- ❖ **Naftti W.** 2019. La question des sciences médicales et pharmalogiques chez les savants algériennes à les l'epoque ottomane. Afak fekriya. **20- 53**, P : 31.
- ❖ **Nevers P.** 2017. Sémiologie des altérations de l'état de santé. France : boeck supérieure. P : 280.
- ❖ **Omran M. A. et Kamal K.F.** 2019. Plantes médicinales et aromatiques et leurs usages médicinaux. Egypte.p : 13.
- ❖ **OMS.** 2005. Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine a l'échèle nationale. 4^{ème} Edition, p : 95.
- ❖ **Oussou K.R., Kanko C., Guessennnd K.N., Yolou S., Koukoua G., Dosso M., N'guessan Y.T., Figueredo G. et Chalchat J.-C.** 2004, Activités antibactériennes des huiles essentielles de trois plantes de Côte d'Ivoire. C. R. Chimie, **7**(10-11), p : 1087-1086.
- ❖ **Ouyahya A. et Viano J.** 1988. Recherches cytogénétiques sur le genre *Artemisia* L. au Maroc. Boletim da Sociedade Broteriana série 2. **61**, p : 105-124
- ✚ **Perdu C.** 2013. Etude de deux protéines impliquées dans l'injection de toxines par la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*. These de doctorat : Université de Grenoble. France. p : 253.
- ✚ **Pianetti C.** 2015. Place du sérodiagnostic dans les infections fongiques invasives à *Candida*. Enquête sur la prescription des sérologies *Candida* au CHU de Nancy et comparaison de deux kits commerciaux ELISA pour la détection des antigènes mannanes et anticorps anti-mannanes. Thèse de doctorat : université de lorraine, France. p : 181.
- ✚ **Ponce A.G., Fritz R., Del valle C.E., Roura S.I.** 2003. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora organic Swiss chard. J lebanmittel-wissenschafi and technologie. N36, p : 679-684.
- ❖ **Prescott M, I. M., Willey J., Sherwood M. L. et Wolverton J, C.** 2018. Microbiologie de Prescott. Paris : Boeck superieur. p : 1120.
- ❖ **Rhind J. P.** 2012. Essential oils : Ahandbook for aromatotherapy praticie. London: edition singing dragon. P : 38
- ❖ **Saleh N.A.M., El-Negoumy S.I. et Abou-Zaid M.M.** 1987. Flavonoids of *Artemisia judaica*, *A. monosperma* and *A. herba-alba*, Phytochemistry. **26** (11), p : 3059-3064.

Références bibliographiques

- ❖ **Saleh N.A.M., El-Newumy S.I., Abdalla M.F., Abou-Zaid M.M., Dellamonica G. et Chopin J.** 1985. Flavonoid glycosides of *Artemisia monosperma* and *A. herba alba*. *Phytochemistry*. **24** (I), p : 201-203.
- ✚ **Silhavy T., Kahne D., Walker S.** 2010. The bacterial cell envelope. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. **2**, p : 1-16.
- ❖ **Taha, R. M.** 2018. Les antibiotiques entre excès et négligence. Les antibiotiques. Université islamique palatine : organisation de la société scientifique arabe. J dans o. d. idaat, p : 01- 181.
- ❖ **Tassou Chrysoula C. et Nychas G.J.E.** 1995. International Biodeterioration & Biodegradation. Antimicrobial activity of the essential oil of mastic gum (*Pistacia lentiscus* var. *chia*) on Gram positive and Gram negative bacteria in broth and in Model Food System. **36**, P : 411-420.
- ✚ **Tefiani C.** 2015. Les propriétés biologiques des huiles essentielles de *Curcuma longa*, *Ammoides verticillata* et *Thymus ciliatus* ssp. *Eu-ciliatus*, Thèse de Doctorat : Université de Mostaganem. Algérie, p : 177.
- ✚ **Toudji A.G., Djeri B., Karou S.D., Tigossu, S., Ameyapoh Y., De-Souza C.** 2017. Prévalence des souches d'enterocobactéries productrices de beta-lactamases à spectre élargi isolées au togo et leur sensibilité aux antibiotiques. *International journal of biological and chemical science*.11(3). P : 1165-1177.
- ✚ **Touil S et Benrebaha F.Z.** 2014. Composition Chimique Et Activité Antimicrobienne Des Huiles Essentielles D'*Artemisia Herba Alba Asso Et Artemisia Campestris L.* De La Région aride de Djelfa. *Agrobiologia*, Volume 4, Numéro 1, P : 40-45.
- ✚ **Vernozy-rozand C., Mazuy C., Ray-Gueniot S., Boutrand-Loei S., Meyarand A., Richard Y.** 1997. Detection of *Escherichia coli* O157 in French food sample using an immunomagnetic separation method and VIDAS *E. coli* O157. *Lett Appl microbial*. **25**, p : 442-446.
- ❖ **Zaibet W.** 2016. Composition chimique et activité biologiques des huiles essentielles des *Daucus aureus* (def) et de *Reutera lutca* (desf) maire, et leur application comme agents antimicrobiennes dans le polyéthylène basse densité(PEBD). Algérie: thèse de doctorat : université de fathat abbas, Setif, Algérie. P : 126.
- ❖ **Zaim A., El Ghadraoui L., et Farah A.** 2012. Effets des huiles essentielles d'*Artemisia herba-alba* sur la survie des criquets adultes d'*Euchorthippus albolineatus* (Lucas, 1849). *Bulletin de l'institut Scientifique : Section sciences de la vie*. **34**(2), p : 127-133.

Annexes

Annexe I**Techniques**

Coloration de Gram			
Étapes	mode opératoire	Qu'est ce qui ce passe?	État des bactéries à cette étape
Coloration au violet de Gentiane	Recouvrir la lame de violet de gentiane	Le violet de gentiane colore les bactéries qu'elles soient Gram + ou Gram -	Toutes les bactéries sont colorées en violet
Laisser agir 1 minute			
Mordançage au lugol	Recouvrir la lame de lugol	Le lugol et le violet de gentiane forment un complexe qui renforce la coloration	Toutes les bactéries sont colorées en violet
Laisser agir 20 secondes puis renouveler le mordançage 2 fois			
Essai de décoloration par l'éthanol	Incliner la lame puis laisser couler de l'éthanol (95°GL) durant 4 secondes. Attention: cette étape est délicate!	La paroi des bactéries à Gram + ne laisse pas passer l'éthanol qui ne peut dissoudre le violet de gentiane. La paroi des bactéries à Gram - laisse passer l'alcool qui dissout le violet de gentiane.	Les bactéries à Gram + restent colorées en violet. Les bactéries à Gram - ne sont plus colorées.
Rincer à l'eau distillé			
Recoloration à la fuschine	Recouvrir la lame de d'eau et ajouter quelques gouttes de fuschine de Zeihl	La fuchsine colore alors les bactéries non colorées	Les bactéries à Gram + restent colorées en violet. Les bactéries à Gram - sont colorées en rose.
Laisser agir 30 secondes à 1 minute puis rincer à l'eau distillé.			

B.C.P.

63854

REF 64444

MILIEU D'ISOLEMENT DES ENTÉROBACTÉRIES ET DE DIFFÉRENCIATION DES ESPÈCES LACTOSE (+) ET LACTOSE (-)

2014/04

1- APPLICATION

La gélose lactosée au bromocrésol-pourpre (B.C.P.) est un milieu non sélectif pour l'isolement et la numération des Entérobactéries. Il permet (également) de différencier les espèces fermentant le lactose de celles qui ne le fermentent pas. Ce milieu est utilisé couramment au cours de l'examen bactériologique des urines et des selles.

2- PRINCIPE

La différenciation des Entérobactéries est basée sur leur capacité à fermenter ou non le lactose. S'il y a fermentation du lactose, cela induit une acidification qui entraîne une coloration jaune des colonies en présence de pourpre de bromocrésol (indicateur de pH).

3- PRÉSENTATION

- Milieu prêt à l'emploi
 - coffret de 20 boîtes de Petri (90 mm) (BCP) code 63854
- Milieu prêt à l'emploi (à répartir)
 - 6 flacons de 200 ml (BCP) code 54376
- Milieu déshydraté 500 g code 64444

4- COMPOSITION THÉORIQUE (en g/l d'eau distillée)

Le milieu est préparé selon la formule décrite par HAJNA et DAMON (1).

Casitone	7,5
Extrait de levure	2
Lactose	10
Agar	25
Pourpre de Bromocrésol	0,02
pH final :	6,8 ± 0,2

Préparation du milieu :

Homogénéiser la poudre contenue dans le flacon.

Mettre 29 grammes de milieu déshydraté dans un litre d'eau distillée stérile. Mélanger jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène. Chauffer lentement, en agitant fréquemment, puis porter à ébullition jusqu'à dissolution complète. Stériliser à 121°C pendant 15 minutes puis répartir en boîtes de Petri ou en flacons.

5- CONSERVATION

- Milieu prêt à l'emploi : +2-8°C.
 - Milieu prêt à l'emploi (à répartir) : +2-25°C.
 - Milieu déshydraté : flacon soigneusement fermé dans un endroit sec et frais.
- La date de péremption et le numéro de lot sont indiqués sur le conditionnement.

6- UTILISATION**Matériel :**

- Matériel fourni : milieu B.C.P.

Ensemencement :

Ensemencer en stries directement à partir de l'échantillon à étudier (suspension de selles, urines). Pour la conservation des échantillons biologiques, se référer aux recommandations en vigueur (2).

Incubation :

Incuber pendant 24 heures à 37°C.

Lecture :

- Lactose (+) : colonies jaunes
- Lactose (-) : colonies bleues

Les colonies Lactose (+) peuvent présenter différents aspects :

- colonies muqueuses : *Klebsiella* et *E. coli*, variété muqueuse (antigène A)
- colonies "smooth" ou "rough" translucides : *E. coli*, *Citrobacter*. Cette caractéristique permet de les différencier des colonies opaques formées par *Bacillus* et les *Micrococcus*.
- colonies jaunes légèrement bleutées à la périphérie : *Escherichia* à caractère lactose (+) lent.

7- PERFORMANCES / CONTRÔLE QUALITÉ

- Aspect du milieu : gélose violet clair
- Aspect du milieu déshydraté : poudre légèrement pourpre
- Les performances culturales du milieu B.C.P. sont contrôlées à l'aide des souches suivantes :

SOUCHES	RESULTAT DE LA CULTURE EN 24H à 37°C
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Colonies jaunes
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	Colonies jaunes
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	Colonies jaunes
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Colonies jaunes
<i>Enterococcus faecalis var zymogenes</i> ATCC 29212	Colonies jaunes
<i>Salmonella Enteritidis</i> ATCC 13076	Colonies bleues
<i>Shigella sonnei</i> ATCC 25931	Colonies bleues
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315	Colonies bleues

8- CONTRÔLE QUALITÉ DU FABRICANT

Tous les produits fabriqués et commercialisés par la société Bio-Rad sont placés sous un système d'assurance qualité de la réception des matières premières jusqu'à la commercialisation des produits finis. Chaque lot de produit fini fait l'objet d'un contrôle de qualité et n'est commercialisé que s'il est conforme aux critères d'acceptation. La documentation relative à la production et au contrôle de chaque lot est conservée par le fabricant.

9- LIMITES D'UTILISATION

- Du fait des exigences nutritionnelles, certaines souches peuvent ne pas se développer sur ce milieu.
- Il est conseillé de ne pas dépasser le délai d'incubation sous peine d'entraîner des erreurs d'interprétation : diffusion de la coloration jaune dans le milieu, réalcalinisation rapide.
- Il est nécessaire de faire des tests complémentaires pour une identification d'espèce de la souche isolée.

10-RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Appl. Microbiol., 4 : 341 : 1956.
2. Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology. World Health Organization. Geneva.1991. 1st edition.



Bio-Rad
3, boulevard Raymond Poincaré
92430 Marnes-la-Coquette - France
Tel. : +33 (0) 1 47 95 60 00
Fax : +33 (0) 1 47 41 91 33
www.bio-rad.com



2014/04

CHAPMAN - MANNITOL SALT AGAR

REF 53647 - 63844 - 64134

Milieu d'isolement et de Différenciation des Staphylocoques

1. APPLICATION

La gélose Chapman - Mannitol Salt Agar est un milieu sélectif pour l'isolement et la numération des staphylocoques. Il permet également de différencier les espèces fermentant le mannitol de celles qui ne le fermentent pas.

2. PRINCIPE

La sélectivité de ce milieu est basée sur la présence de chlorure de sodium qui inhibe la plupart des bactéries à Gram (+) et à Gram (-). La différenciation des Staphylocoques est basée sur leur capacité à fermenter ou non le mannitol. S'il y a fermentation, cela induit une acidification qui entraîne une coloration jaune du milieu en présence de rouge de phénol (indicateur de pH).

3. PRESENTATION

- Milieu prêt à l'emploi
 - coffret de 20 boîtes de Petri (90 mm) (**MSA**) code 63844
- Milieu prêt à l'emploi (à répartir)
 - 6 flacons de 200 ml (**MSA**) code 53647
- Milieu déshydraté
 - flacon de 500 g code 64134

4. COMPOSITION THEORIQUE (en g/l d'eau distillée)

Le milieu Chapman - Mannitol Salt Agar est préparé selon la formule décrite par Chapman (1).

- Peptone 10
- Extrait de viande de bœuf 1
- Chlorure de sodium 75
- Mannitol 10
- Rouge de phénol 0.025
- Agar 15
- pH final : 7.4 ± 0.2

Préparation du milieu :

Homogénéiser la poudre contenue dans le flacon.

Mettre **111 grammes** de milieu déshydraté dans un litre d'eau distillée stérile. Mélanger jusqu'à obtention d'une suspension homogène. Chauffer lentement en agitant fréquemment, puis porter à ébullition jusqu'à dissolution complète. Stériliser à l'autoclave à 121° C pendant 15 minutes. Répartir en boîtes de Petri ou en flacons.

5. CONSERVATION

- Milieu prêt à l'emploi (Petri) : à + 2 - 20°C.
- Milieu prêt à l'emploi (tubes et flacon) : à + 2 - 8°C.
- Milieu déshydraté : flacon soigneusement fermé dans un endroit sec à +15-25°C.

La date de péremption et le numéro de lot sont indiqués sur le conditionnement.

6. UTILISATION

Matériel :

- Matériel fourni : milieu Chapman – Mannitol Salt Agar

Ensemencement :

Ensemencer directement en stries à partir de l'échantillon à étudier. Pour la conservation des échantillons biologiques, se référer aux recommandations en vigueur (2).

Incubation :

Incuber pendant 24 à 48 heures à 37°C.

Lecture :

- Mannitol (+) : coloration **jaune** du milieu.
- Mannitol (-) : absence de coloration.

Les souches de *Staphylococcus aureus* élaborent leur propre pigment. Les colonies s'entourent en 24 à 48 heures d'une auréole **jaune** due à la fermentation du mannitol. Les souches de *Staphylococcus epidermidis* et autres *Micrococcaceae* donnent naissance à de petites colonies, qui, dans la majorité des cas, se développent sans modifier la teinte du milieu. Cependant, une minorité non négligeable de souches de *S. epidermidis* est capable de fermenter le mannitol.

7. PERFORMANCES / CONTRÔLE QUALITE DU TEST

- Aspect du milieu prêt à l'emploi : gélose limpide **rouge**.
- Aspect du milieu déshydraté : poudre **rosée**.
- Les performances culturales du milieu de Chapman - Mannitol Salt Agar sont contrôlées à l'aide des souches suivantes :

SOUCHES	RÉSULTAT DE LA CULTURE EN 24-48 H à 37°C
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Colonies jaunes
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> ATCC 15305	Colonies jaunes
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	Colonies rosées
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	Inhibition partielle
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Inhibition

8. CONTRÔLE QUALITE DU FABRICANT

Tous les produits fabriqués et commercialisés par la société Bio-Rad sont placés sous un système d'assurance qualité de la réception des matières premières jusqu'à la commercialisation des produits finis. Chaque lot de produit fini fait l'objet d'un contrôle de qualité et n'est commercialisé que s'il est conforme aux critères d'acceptation. La documentation relative à la production et au contrôle de chaque lot est conservée par le fabricant.

9. LIMITES D'UTILISATION

- Il est nécessaire de faire des tests complémentaires pour une identification d'espèce de la souche isolée.
- Les entérocoques et les streptocoques du groupe D peuvent se développer sur ce milieu et présenter une légère fermentation du mannitol. Cependant les colonies sont petites et peuvent facilement être différenciées des staphylocoques par coloration de Gram ou par le test de la catalase.

10. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. CHAPMAN, G.H., The significance of sodium chloride in studies of staphylococci, J. Bact. 1945. **50** : 201-203.
2. Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology. World Health Organization. Geneva.1991. 1st edition.



Bio-Rad
3, boulevard Raymond Poincaré
92430 Marnes-la-Coquette France
Tel.: +33 (0) 1 47 95 60 00
Fax: +33 (0) 1 47 41 91 33
www.bio-rad.com



05/2011

KING B MILIEU DE DIFFÉRENCIATION DES *PSEUDOMONAS*

55278

IVD

1- APPLICATION

Le milieu de King B permet la détection de la synthèse de pyoverdine, pigment élaboré par *Pseudomonas aeruginosa* et d'autres *Pseudomonas*. Utilisé en parallèle avec le milieu de King A (détection de la pyocyanine), Il permet d'orienter l'identification de *Pseudomonas aeruginosa*.

2- PRINCIPE

La présence de sulfate de magnésium fournit les cations nécessaires à l'activation de la pyoverdine qui se manifeste en colorant le milieu de culture en vert-jaune fluorescent. La présence de phosphate permet d'inhiber la production de pyocyanine, pigment spécifique de *Pseudomonas aeruginosa*.

3- PRESENTATION

- Milieu prêt à l'emploi
25 tubes de 7 ml code 55278

4- COMPOSITION THEORIQUE (en g/l d'eau distillée)

La gélose King B est préparée selon la formule théorique décrite par King, Ward et Raney (1).

Peptone	20
Agar purifié	12
K ₂ HPO ₄ (anhydre)	1,5
MgSO ₄ · 7 H ₂ O (anhydre)	1,5

5- CONSERVATION

- Milieu prêt à l'emploi : à + 2 - 8°C.
- La date de péremption et le numéro de lot sont indiqués sur la conditionnement.

6- UTILISATION

Matériel :

- Matériel fourni : milieu King B

Ensemencement :

Ensemencer en faisant une strie médiane à la surface de la gélose avec une ose de culture pure et fraîche prise dans un bouillon ou sur un milieu gélosé. Replacer la capsule sans la revisser.

Incubation :

Incuber pendant 24 à 48 heures à 30°C. Au-delà, l'incubation à l'étuve est inutile, mais il est possible de conserver les cultures à température ambiante (18-30°C).

Lecture - Interprétation :

Une synthèse de pyoverdine se traduit par une coloration **verte** fluorescente.

7- PERFORMANCES / CONTRÔLE QUALITE DU TEST

- Aspect du milieu prêt à l'emploi : gélose limpide **ambrée**.
- Les performances culturales du milieu King B sont contrôlées à l'aide des souches suivantes :

SOUCHES	PIGMENTATION EN 24 - 48H À 30°C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Jaune-verte
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Jaune-verte
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 17934	Jaune-verte
<i>Pseudomonas fluorescens</i> CIP 69.13	Jaune-verte faible

8- CONTROLE QUALITE DU FABRICANT

Tous les produits fabriqués et commercialisés par la société Bio-Rad sont placés sous un système d'assurance qualité de la réception des matières premières jusqu'à la commercialisation des produits finis. Chaque lot de produit fini fait l'objet d'un contrôle de qualité et n'est commercialisé que s'il est conforme aux critères d'acceptations. La documentation relative à la production et au contrôle de chaque lot est conservée par le fabricant.

9- LIMITES D'UTILISATION

- Certaines souches de *P. fluorescens* ou de *P. putida* (provenant en général de l'eau ou du sol) n'élaborent que lentement la pyoverdine. Il faut alors incuber le milieu à 20°C pendant 2 à 3 semaines. Certaines de ces souches peuvent être apigmentés.
- Du fait de leurs exigences nutritionnelles, certains micro-organismes peuvent ne pas se développer sur ce milieu.
- Il est indispensable de procéder à partir de cultures pures et fraîches pour que les résultats puissent être interprétés.
- Il est recommandé de faire des tests complémentaires pour une identification d'espèce de la souche isolée.

10- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. KING E.O., WARD M. et RANEY D.E.J., J. Lab. Clin. Méd., 1954, 44, p. 301.

Bio-Rad

3, boulevard Raymond Poincaré
92430 Marnes-la-Coquette France
Tel.: +33 (0) 1 47 95 60 00
Fax: +33 (0) 1 47 41 91 33



08/2009

355-6524

Milieu gélosé C(gélose Sabouraud avec glucose)
Sabouraud gélose (XIX)

355-6519

356-4494

DOMAINE D'APPLICATION

La gélose de Sabouraud est utilisée pour l'isolement, l'identification et la culture des levures et moisissures à partir de prélèvements peu souillés par les bactéries.

Ce milieu est recommandé par le Codex de la Pharmacopée Française pour les contrôles de stérilité des produits pharmaceutiques.

Equivalent USP 30/NF 25 : Milieu XIX

REFERENCE(S)

• **USP 30/NF 25 US Pharmacopeia and National Formulary (2007)** : Microbial Limit Tests (61) - Microbiological Tests

• **Pharmacopée Européenne 6.0** - Méthodes Biologiques - 2.6.13. : Contrôle Microbiologique des produits non stériles (Recherche de micro-organismes spécifiés)

PRINCIPE

La croissance rapide des levures et des moisissures est favorisée par la présence des substances nutritives apportées par la peptone et par celle du glucose utilisé comme source énergétique. L'ajout de différents antibiotiques peut être réalisé afin de rendre le milieu inhibiteur vis-à-vis des bactéries.

PRESENTATION

- **Prêt à l'emploi**
8 ml x 25 tubes (incl.) **code 355-6524**
100 ml x 6 flacons **code 355-6519**
- **Déshydraté**
500 g **code 356-4494**

CONSERVATION/VALIDITE/LOT

- Prêt à l'emploi : à +2-8°C
- Déshydraté : +15-25°C, flacon soigneusement fermé dans un endroit frais et sec
- La date de péremption et le numéro de lot sont indiqués sur le conditionnement.

FORMULE THEORIQUE

Peptone	10 g
Glucose	40 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml

pH (25°C) final = 5,6 – 6,0

NB : Des adaptations de la formule ont pu être réalisées afin d'atteindre les critères de performance requis.

AUTRE(S) PRODUIT(S) NECESSAIRE(S) (NON FOURNI(S))

- Diluant(s)
- Eau distillée

MATERIEL NECESSAIRE NON FOURNI

(liste non exhaustive)

- Balance
- Sacs de pesée stériles
- Broyeur
- Plaque chauffante
- Agitateur-homogénéisateur
- Tubes à essais (16 x 160 mm) avecouchons autoclavables
- Flacons de 125 ml en Pyrex avec bouchons autoclavables
- Boîtes de pétri stériles (Ø = 90 mm)
- Pipettes stériles (1 ml,...)
- Étaleurs stériles
- Bain-marie avec une précision de ±1°C
- Etuve ou enceinte thermostatée avec une précision de ±1°C
- Autoclave
- Tout matériel courant d'un laboratoire

PREPARATION DU MILIEU DESHYDRATE

Toujours agiter avant chaque utilisation.

Dissoudre 42 grammes de poudre dans 1 litre d'eau distillée.

Chauffer lentement en agitant fréquemment, puis porter à ébullition jusqu'à dissolution complète.

Répartir à raison de 8 ml par tubes ou de 100 ml par flacon, et stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 20 minutes.

**Taux de reconstitution : 42 g/l
500 grammes de poudre permettent de
réaliser 11,9 litres de milieu.**

PROTOCOLE**Ensemencement et incubation**

Ajouter éventuellement de la Gentamicine ou du Chloramphénicol.

Homogénéiser et couler en boîtes de Petri stériles.

Transférer l'échantillon à analyser et étaler à l'aide d'un étaleur stérile.

Incuber à 32°C ± 1°C pendant 3 à 7 jours.

Milieu gélosé C

(gélose Sabouraud avec glucose)
Sabouraud gélose (XIX)

LECTURE ET INTERPRETATION

Dénombrer séparément les levures et les moisissures dans les boîtes contenant entre 15 et 150 colonies.

PRECAUTION D'EMPLOI

Respecter les Bonnes Pratiques de Laboratoire.

CONTROLE QUALITE

Au regard des travaux préalables à l'harmonisation des pharmacopées actuellement en cours, nous vous recommandons de vous reporter aux certificats de contrôle pour connaître les modalités mise en œuvre pour le contrôle de la qualité (performance et sélectivité) des milieux de culture fabriqués par Bio-Rad.

Tous les produits fabriqués et commercialisés par la société Bio-Rad sont placés sous un système d'assurance qualité de la réception des matières premières jusqu'à la commercialisation des produits finis.

Chaque lot du produit fini fait l'objet d'un contrôle de qualité et il n'est commercialisé que s'il est conforme aux critères d'acceptation.

La documentation relative à la production et au contrôle de chaque lot est conservée.

MOTS CLES

Sabouraud/Levures/Moisissures/
Produits pharmaceutiques/Isolement/
Identification/Culture/Gélose/Glucose/Milieu

MUELLER-HINTON

69444

BOUILLON / MILIEU DE CULTURE POUR L'ETUDE DE LA SENSIBILITE AUX AGENTS ANTIBACTERIENS

IVD

1- APPLICATION

Le bouillon Mueller-Hinton est un milieu liquide nutritif utilisé pour l'étude de la sensibilité des bactéries aérobies et anaérobies facultatives vis à vis des agents antimicrobiens. Il est utilisé comme milieu de culture pour réaliser la technique d'antibiogramme en méthode de dilution (1, 2) ou bien comme milieu de base pour préparer tout inoculum bactérien.

2- PRINCIPE

La précision des résultats d'antibiogramme est assurée par la standardisation de la composition du milieu utilisé. Des variations de pH, de concentration en cations divalents ou/et en thymidine peuvent entraîner des différences dans les résultats obtenus. Par conséquent, le bouillon Mueller-Hinton Bio-Rad est faiblement concentré en thymine et en thymidine et la concentration en calcium et en magnésium est contrôlée. Cette formulation permet d'assurer l'exactitude de Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) obtenues avec les souches de contrôle recommandées par les références internationales (4,5).

3- PRESENTATION

- Milieu déshydraté
- flacon de 500 g code 69444

4- COMPOSITION THEORIQUE (en g/l d'eau distillée)*

Le milieu Mueller-Hinton avec ou sans addition de sang de mouton est préparé selon la formule décrite par W.H.O. (4)

Infusion de viande	2,0
Hydrolysate de caséine	17,5
Amidon de maïs	1,5
pH final	7,3 ± 0,1
Ca ²⁺	20 - 25 mg/L
Mg ²⁺	10 - 12,5 mg/L

* formule adaptée pour assurer les meilleures performances du milieu.

Préparation du milieu :

Homogénéiser la poudre contenue dans le flacon.

Mélanger **25 grammes** de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée stérile jusqu'à obtention d'une suspension homogène. Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes. Répartir en tubes ou flacons stériles.

5- CONSERVATION

- Milieu déshydraté : flacon soigneusement fermé dans un endroit sec et frais (15-25°C).
- La date de péremption et le numéro de lot sont indiqués sur le conditionnement.

6- UTILISATION

Matériel :

- Matériel fourni : Milieu Mueller-Hinton
- Matériel spécifique non fourni :

BIO-RAD

- Témoin d'opacité Mac Farland 0,5
- Matériel de laboratoire nécessaire pour la réalisation des antibiogrammes par la méthode de diffusion en milieu liquide.

Précautions d'utilisation : Suivre les instructions d'utilisation des recommandations en vigueur (CLSI⁽⁴⁾, CA-SFM⁽⁵⁾). Observer à tout moment les techniques et précautions en vigueur en matière de protection contre les dangers microbiologiques.

Ensemencement :

A partir d'une culture pure et fraîche, préparer une suspension en bouillon Mueller-Hinton équivalente au standard Mc Farland 0,5. Le protocole de standardisation de l'inoculum est décrit dans les différentes recommandations émises par le CLSI et le CA-SFM pour la méthode en diffusion.

Incubation :

Le bouillon Mueller-Hinton peut être utilisé pour la préparation de l'inoculum bactérien et comme milieu de culture pour la réalisation des CMI.

Se référer aux recommandations du CLSI et/ou du CA-SFM pour les procédures détaillées (4,5).

Interprétation :

L'interprétation du test de sensibilité aux antibiotiques selon la méthode des CMI est détaillée dans les mises à jour périodiques du CA-SFM et du CLSI.

9- PERFORMANCES / CONTRÔLE QUALITE

- Aspect du milieu déshydraté : poudre **beige**.
- Les performances culturales du milieu de Mueller-Hinton sont contrôlées à l'aide des souches suivantes :

SOUCHES	ANTIBIOGRAMME LIQUIDE CMI en µg / ml
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 · Ampicillin · Tetracycline	CMI conformes aux recommandations CLSI
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 · Tobramycine · Ciprofloxacine	
<i>Enterococcus faecalis</i> var <i>zymogenes</i> ATCC 29212 · Triméthoprim / Sulfaméthoxazole	

10-LIMITES D'UTILISATION

- Il est indispensable de procéder à partir de cultures pures et fraîches afin d'éviter de faux résultats.
- Certaines bactéries peuvent ne pas se développer sur ce milieu du fait de leurs exigences nutritionnelles particulièrement *Haemophilus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae* et les streptocoques β hémolytiques. Il est donc conseillé de suivre les recommandations du CLSI et/ ou du CA-SFM.
- Un certain nombre de facteurs peuvent affecter les résultats (taille de l'inoculum, durée et atmosphère d'incubation...) Il est donc impératif de respecter le protocole décrit dans la procédure en vigueur (CLSI, CASFM...).

11-CONTRÔLE QUALITE DU FABRICANT

Tous les produits fabriqués et commercialisés par la société Bio-Rad sont placés sous un système d'assurance qualité de la réception des matières premières jusqu'à la commercialisation des produits finis. Chaque lot de produit fini fait l'objet d'un contrôle de qualité et n'est commercialisé que s'il est conforme aux critères d'acceptation. La documentation relative à la production et au contrôle de chaque lot est conservée par le fabricant.

12-REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. MUELLER J.H. and HINTON J. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1941, **48**, 330-333.
2. OLSENA M. and SCOTT W.J. Nature, 1946, **157**, 337.
3. C.L.S.I. M7-A. 1985. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard.
4. C.L.S.I.-M32-P. Evaluation of Lots of Dehydrated Mueller-Hinton Broth for Antimicrobial Susceptibility Testing; Proposed Guideline.
5. Comité de l'antibiogramme. Société Française de Microbiologie. (<http://www.sfm.asso.fr/>).
6. World Health Organization Expert Committee on Biological Standardization. 1981. Technical report series 673 (Révision 1981). W.H.O., Geneva – p156-192.

Bio-Rad

3, boulevard Raymond Poincaré
92430 Marnes-la-Coquette France
Tel. : +33 (0) 1 47 95 60 00
Fax : +33 (0) 1 47 41 91 33

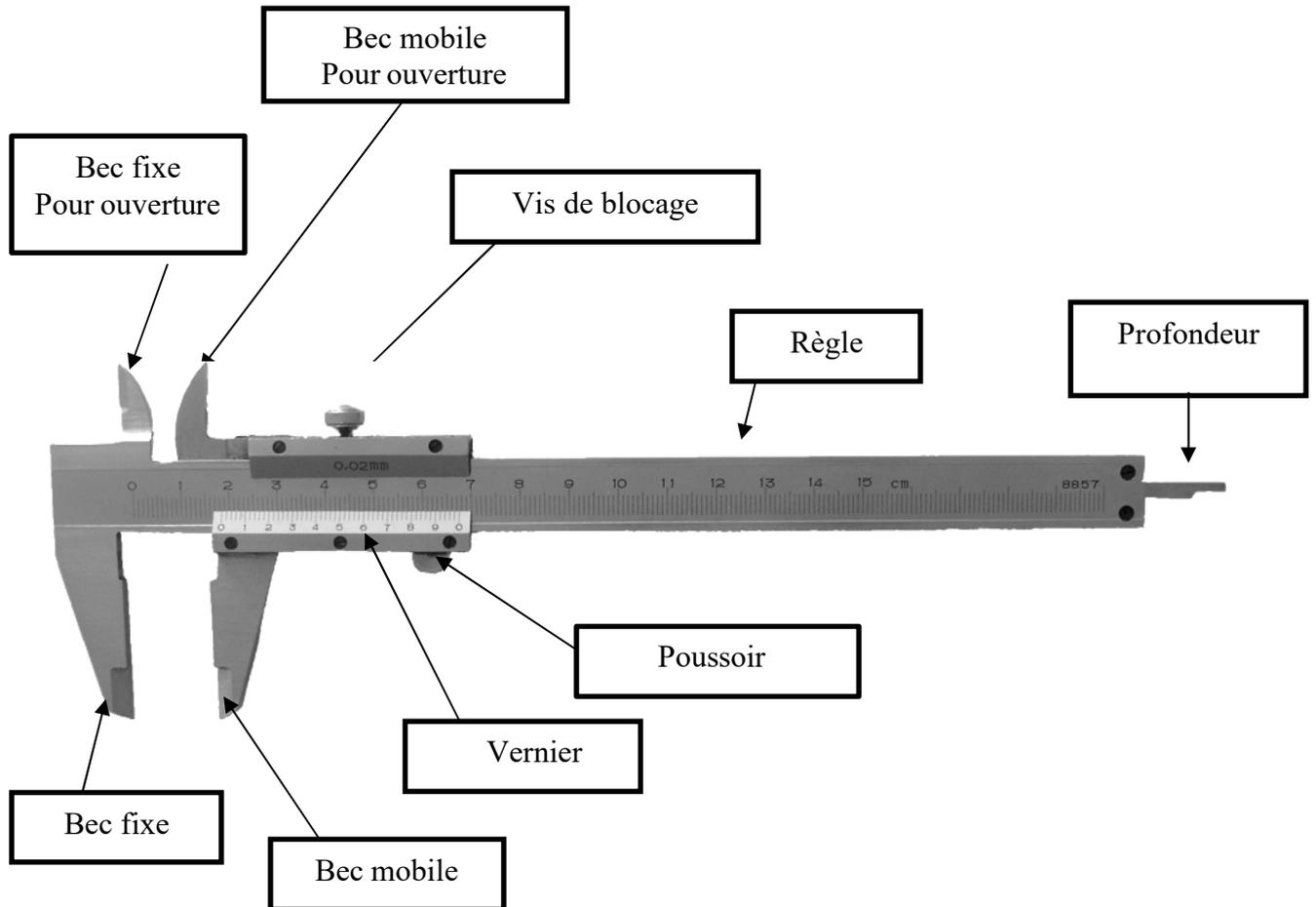


Annexe III

MESURER	Classe : LPC. STOESSEL
Le pied à coulisse	Nom : 1/2

1. Définition :

Le pied à coulisse est un outil de mesure qui permet d'obtenir un résultat au 1/50 de millimètre



Il existe différentes formes de pieds à coulisse.

