



Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem

Département de Biologie

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biologie

Option : Biotechnologie des microorganismes

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Sous le thème :

Recherche des huiles essentielles de plantes inhibitrices de quelques entérobactéries résistantes aux antibiotiques.

Présenté par : Melle BELGHIT Meriem

Devant le jury :

Président : Mr. MIKHALDI A.

Examineur : Mme. ROBAI W.

Encadreur : Mr. DJIBAOUI R.

Co-encadreur : Mr. ARABI A.

Structures d'accueil du Stage pratique : Laboratoire d'analyses EPH Ain Tedles – Laboratoire d'hygiène de Mostaganem – Laboratoire de microbiologie I Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem

Année Universitaire : 2015/2016.



Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem

Département de Biologie

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biologie

Option : Biotechnologie des microorganismes

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Sous le thème :

Recherche des huiles essentielles de plantes inhibitrices de quelques entérobactéries résistantes aux antibiotiques.

Présenté par : Melle BELGHIT Meriem

Devant le jury :

Président : Mr. MIKHALDI A.

Examineur : Mme.ROBAI W.

Encadreur : Mr. DJIBAOUI R.

Co-encadreur : Mr. ARABI A.

Structures d'accueil du Stage pratique : Laboratoire d'analyses EPH Ain Tedles – Laboratoire d'hygiène de Mostaganem – Laboratoire de microbiologie I Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem

Année Universitaire : 2015/2016.

Remerciements

Avant toute chose, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donné la force et la patience.

Je remercie mes parents pour m'avoir encouragé et permis d'entreprendre cette formation. Sans eux, je n'en serais pas là.

J'adresse tout d'abord mes sincères remerciements à **Mr. DJIBAOUI Rachid** d'avoir accepté de diriger ce mémoire.

Je souhaite néanmoins remercier plus particulièrement **Mr. ARABI Abed** d'avoir accepté de co-diriger ce travail, pour son indéfectible soutien scientifique, pour ces précieuses critiques et ses judicieux conseils qui m'ont été très utiles pour la bonne réussite de cette thèse. Je tiens à lui exprimer ma très vive gratitude pour sa disponibilité tout au long de mon stage et pour tout ce qu'il m'a appris.

J'adresse mes profonds remerciements à **Mr. MEKHALDI** et **Mme. ROBAI** pour avoir accepté de juger ce travail et de faire partie de mon jury de mémoire. C'est un très grand honneur et un très grand plaisir d'avoir pu faire leur connaissance et de pouvoir aujourd'hui leur soumettre mon travail.

Un grand merci à **Mr. RZIGUA Charef** pour son aide et sa gentillesse.

Je tiens à remercier la technicienne du laboratoire de microbiologie **Mme Hafida** pour ses conseils et sa confiance.

Dédicaces

A tous ceux qui me sont chers.

Sommaire

Introduction.....	1
Chapitre I : La microflore digestive et l'antibiorésistance.....	2
I-2- Flore bactérienne normale du tube digestif	2
I-3- Répartition topographique de la flore digestive.....	2
I-3-1- Les flores buccales et oropharyngées.....	3
I-3-2- La flore gastrique	3
I-3-3- L'intestin grêle (petit intestin)	3
I-3-4- Le gros intestin (colon)	3
I-3-5- La flore fécale.....	4
I-4- La composition classique d'une flore digestive	4
I-5- Rôle de la flore digestive.....	4
I-5-1- Effet de la flore intestinale	4
I-5-2- Les métabolites.....	4
I-5-3- la flore intestinale une barrière indispensable.....	5
I-6- Facteur d'agression de la flore digestive	5
I-6-1- L'utilisation des traitements anti-acide	5
I-6-2- Carence en fibres alimentaires	5
I-6-3- Gastroentérite aigue.....	5
I-6-4- l'antibiothérapie	6
I-7- Mode d'action des antibiotiques	6
I-7-1- Toxicité sélective.....	6
I-7-2- Inhibition compétitive	6
I-7-3- La résistance bactérienne aux antibiotiques	7
I-7-4- Mécanismes de résistance.....	8
Chapitre II : Présentation de <i>Artemisia herba alba</i> et <i>Pistacia lentiscus L</i> et l'aromathérapie.....	10
II-1-Introduction	10
II-2- <i>Artemisia herba alba</i>	10
II-2-1- Définition	10
II-2-2- Classification	10
II-2-3- Description botanique	10

.....	11
II-2-4- Répartition de la plante en Algérie	11
II-3- <i>Pistacia lentiscus L</i>	11
II-3-1- Définition	11
II-3-2- Classification	12
(Judd et <i>al.</i> , 2002. Lieutaghi., 2004.Yaaqobi et <i>al.</i> , 2009).....	12
II-3-3- Description botanique	12
.....	12
II-3-4- Répartition en Algérie.....	13
II-3-5- Produits et dérivées à base de la plante.....	13
II-4- Les huiles essentielles	13
II-4-1- Définition	13
II-4-2- Propriétés physiques et chimiques des huiles essentielles	14
II-4-3- Techniques d'extractions.....	14
II-4-4- Méthodes d'analyses des huiles essentielles	18
II-4-5- composition chimique des huiles essentielles de <i>Artemisia herba alba</i> et <i>Pistacia lentiscus L</i>	19
II-4-6- Mode d'action des huiles essentielles.....	20
II-4-7- Rôle des huiles essentielles	20
II-4-8- Domaine d'utilisation des huiles essentielles.....	22
II-4-9- Toxicologie des huiles essentielles	22
Chapitre III : Matériels et méthodes	24
III-1- Objectif du travail	24
III-2- Bactéries de choix	24
III-3- Origine des bactéries	24
III-4- Isolement et identification des bactéries	24
III-4-1- Isolement.....	25
III-4-2- Identification.....	25
III-5- Antibiogramme	27
III-6- Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de <i>Artemisia herba alba</i> et <i>Pistacia lentiscus L</i> vis-à-vis les bactéries étudiées.....	30
III-6-1- Matériels végétale	30
.....	31
III-6-2- Extraction des huiles essentielles de <i>Artemisia herba alba</i> et <i>Pistacia lentiscus L</i>	31
III-6-3- Calcul du rendement	32

III-7- Mis en évidence de l'effet des huiles essentielles de <i>Artemisia herba alba</i> et <i>Pistacia lentiscus L</i> sur les bactéries étudiées	32
III-7-1- Mode opératoire.....	33
III-7-2-Lecture	33
III-8- Détermination de la CMI et la CMB des huiles essentielles de <i>Artemisia herba alba</i> et <i>Pistacia lentiscus L</i> sur les bactéries étudiées	33
III-8-1- Préparation des dilutions des huiles essentielles.....	33
III-8-2- Préparation de l'inoculum	33
III-8-3- Détermination de la CMI en milieu liquide.....	34
III-8-4- Détermination de CMB	36
Chapitre IV : Résultats et discussion	37
IV-1- Isolement et identification des bactéries	37
IV-1-1- Examen macroscopique	37
IV-1-2- Examen microscopique	39
.....	41
.....	41
.....	41
.....	41
.....	41
.....	41
<i>Citrobacter brakii</i>	41
.....	41
.....	41
IV-1-3- Etude du type respiratoire	42
IV-1-4- Tests biochimiques	43
IV-1-5- Test de coagulase	45
IV-2- Antibiogramme.....	46
IV-3- Effet antibactérien des huiles essentielles de <i>Artemisia herba alba</i> et de <i>Pistacia lentiscus L</i>	56
IV-3-1- Extraction des huiles essentielles de <i>Artemisia Herba Alba</i> et de <i>Pistacia lentiscus L</i>	56
IV-3-2- Activité antimicrobienne des huiles essentielles de <i>Artemisia herba alba</i> et de <i>Pistacia lentiscus L</i> vis-à-vis des bactéries étudiées	58
IV-3-3- Détermination de la CMI des huiles essentielles en milieu liquide.....	62
IV-3-4- Détermination de la CMB des huiles essentielles en milieu solide	62
Conclusion	68
Référence bibliographiques	69
Annexes	77

Liste des abréviations

ml : millilitre.

g : gramme.

pH : potentiel d'hydrogène.

% : pourcentage.

UFC : unités formant colonies.

GEA : gastroentérite aiguë.

MC : maladie de Crohn.

SFM : La Société Française de Microbiologie.

CMI : concentrations minimales inhibitrices.

cm : centimètre.

°C : Celsius.

CO₂ : dioxyde de carbone.

P : pression.

T : température.

CCM : Chromatographie sur couche mince.

CPG : chromatographie en phase gazeuse.

IR : Infrarouge.

RMN : résonance magnétique nucléaire.

SM : Spectroscopie de masse.

ATP : adénosine triphosphate.

ADN : acide désoxyribonucléique.

ADP : adénosine diphosphate.

ARN : acide ribonucléique.

EPH : établissement public hôpital.

BCP : pourpre de bromocrésol.

H₂S : thiosulfure d'hydrogène.

NaCl : chlorure de sodium.

TSI : trois sucre iron.

ONPG : orthonitrophényl-galactopyranoside

RM : rouge de méthyle.

VP : Voges-Proskauer.

LDC : lysine décarboxylase.

EDTA : éthylène diamine tétra-acétique.

BHIB : bouillon cœur cervelle.

Nm : nanomètre.

R : rendement.

µl : microlitre.

CMB : concentration minimale inhibitrice

DMSO: Diméthyle sulfoxyde.

ODC: ornithine decarboxylase.

ADH : arginine dihydrolase.

LDC : lysine décarboxylase.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Choix des antibiotiques vis-à-vis des bactéries étudiées.....	29
Tableau 2: Examen à l'état frais des bactéries	39
Tableau 3: Coloration de Gram des bactéries étudiées	40
Tableau 4: Résultats des tests de type respiratoire des bactéries étudiées	42
Tableau 5: Résultats du TSI des bactéries étudiées	43
Tableau 6: Lecture des résultats d'une galerie biochimique API 20	45
Tableau 7: Sensibilité des bactéries étudiées aux antibiotiques testés.....	47
Tableau 8: Quantité des huiles essentielles obtenues par hydrodistillation de <i>Artemisia herba alba</i> . 56	
Tableau 9: Quantité des huiles essentielles obtenues par hydrodistillation de <i>Pistacia lentiscus</i> L	57
Tableau 10: Résultats de l'effet inhibiteur des huiles essentielles de <i>Artemisia herba alba</i> et de <i>Pistacia lentiscus</i> L vis-à-vis des bactéries étudiées.....	59
Tableau 11: Résultats de la CMI et la CMB des huiles essentielles testées	62
Tableau 12: Lecture des résultats d'une galerie biochimique API 20	77

Liste des figures

Figure n° 1 : Répartition de la flore digestive (Goulet., 2009).....	2
Figure n° 2 : Mode d'action des antibiotiques (www.bacteriologie.net).....	7
Figure n° 3 : <i>Artemisia herba alba</i> (Algeria native plants.net).....	11
Figure n° 4 : <i>Pistacia lentiscus L.</i> (algerianativeplants.net).....	12
Figure n° 5 : Extraction par hydro-distillation (Goulet., 2009).....	15
Figure n° 6 : Extraction par micro-onde (Mengel et al., 1993).....	16
Figure n° 7 : Extraction par CO2 supercritique (Pelleri., 1991).....	17
Figure n° 8 : <i>Artemisia herba alba</i>	30
Figure n° 9 : <i>Pistacia lentiscus L.</i>	31
Figure n° 10 : Schéma du montage d'hydro-distillation (Clevenger). (Mengal et, MoPON, 1994).....	32
Figure n° 11: Schéma de la détermination de la CMI.....	35
Figure n° 12: Schéma de la détermination de la CM.....	36
Figure n° 13: Examen macroscopique des bactéries étudiées.....	38
Figure n° 14: Coloration de Gram des bactéries étudiées 100.....	41
Figure n° 15: Résultats des tests du type respiratoire des bactéries étudiées.....	43
Figure n° 16 : Résultats des API 20 E des bactéries étudiées.....	44
Figure n° 17: Résultat du test de la coagulase chez les staphylococcus aureus.....	46
figure n° 18: Résultats de l'antibiogramme des bactéries étudiées.....	54
Figure n° 19: Evaluation de la résistance aux antibiotiques des quatres bactéries étudiées.....	56
Figure n° 20 : Extraction des huiles essentielles de <i>Artemisia herba alba</i> et <i>Pistacia lentiscus L</i> par hydrodistillation.....	58
Figure n° 21 : Résultats de l'effet des huiles essentielles de <i>Artemisia herba alba</i> sur les bactéries résistantes aux antibiotiques.....	60
Figure n° 22 : Résultats de l'effet des huiles essentielles de <i>Pistacia lentiscus L</i> sur les bactéries résistantes aux antibiotiques.....	61
Figure n° 23 : Résultats de la CMI des huiles essentielles de <i>Artemisia herba alba</i> en milieu liquide de <i>E. coli</i>	63
Figure n° 24 : Résultats de la CMB des huiles essentielles de <i>Artemisia herba alba</i> pour <i>E.coli</i>	63
Figure n° 25 : Résultats de la CMI des huiles essentielles de <i>Pistacia lentiscus L</i> en milieu liquide de <i>E.coli</i>	64
Figure n° 26 : Résultats de la CMB des huiles essentielles de <i>Pistacia lentiscus L</i> de <i>E.coli</i>	64

Introduction

Avec la généralisation, à la fin des années 1940, de l'utilisation des antibiotiques, les médecins ont commencé à vaincre les maladies infectieuses qui ravageaient l'humanité depuis si longtemps. Mais, ensuite, à la fin des années 1980 et dans les années 1990, les antibiotiques ont commencé à ne plus être salués comme le miracle qu'ils avaient semblé être 40 ans plus tôt.

Pourtant, dès 1945, le bactériologiste britannique Alexander Fleming a lancé un avertissement dans un article publié dans le *New York Times*. Il craignait qu'un mauvais usage de la pénicilline ne conduise à sélectionner et à propager des formes mutantes de bactéries résistantes aux médicaments.

Il avait raison, ses paroles étaient prémonitoires : de nombreuses bactéries ont développé une résistance à la plupart des antibiotiques.

En fait, un mauvais usage des antibiotiques sélectionne les bactéries résistantes, tandis que les souches résistantes sélectionnées chez un individu qui ne tombe pas forcément malade lui-même peuvent se transmettre à d'autres. La personne touchée peut alors développer une forme de maladie contre laquelle les antibiotiques deviennent inefficaces.

Par ailleurs, la généralisation d'une utilisation excessive des antibiotiques à large spectre semble également avoir favorisé un nouveau problème. Elle est souvent la cause d'une infection secondaire par des levures, en particulier par *Candida albicans*.

Les études montrent que les huiles essentielles pourraient bien constituer une candidature particulièrement crédible.

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles est connue de façon empirique depuis l'Antiquité.

Des études expérimentales ont été entreprises en France dès 1885. En 1888, Cadeac et Meunier publient leurs recherches dans les *Annales de l'Institut Pasteur*.

De nombreuses études *in vitro* ont été réalisées par des médecins et des pharmaciens avec des résultats concluants. Dans son livre *Antiseptiques essentiels* publié en 1938, René-Maurice Gattefossé, le père de l'aromathérapie, décrit déjà la considérable avancée de la recherche dans ce domaine.

Depuis, de nombreux travaux, essentiellement de laboratoire, sont venus renforcer ces résultats, expliquer les modes d'actions de certains de leurs composants.

Dans cette étude nous avons essayé de mettre en évidence l'effet anti-bactériens des huiles essentielles de *Artemisia herba alba* et *Pistacia lentiscus L* sur la flore digestive multi-résistante aux antibiotiques.

Chapitre I : La microflore digestive et l'antibiorésistance

I-1- Définition de la flore digestive

La flore bactérienne de l'appareil gastro-intestinal est complexe, elle varie selon les espèces (animales et humaines), l'âge, les régimes alimentaires et l'utilisation des antibiotiques (Cummings. 1997).

I-2- Flore bactérienne normale du tube digestif

La flore intestinale également appelée le microbiote intestinal, est constituée des différentes bactéries et autres microorganismes qui se trouvent naturellement dans les organes composants le tube digestif. Ces bactéries intestinales sont présentes par millions et aident au bon fonctionnement de l'organisme en permettant notamment une aide à la dégradation de certaines molécules en substrats absorbables. Elles protègent encore contre l'envahissement du tube digestif par d'autres bactéries pathogènes. Des facteurs comme le stress, les antibiotiques et l'alimentation peuvent influencer sur l'équilibre de la flore intestinale et en cas de déséquilibre, des désordres digestifs à type de ballonnements, diarrhées ou vomissement peuvent survenir (Pierrick Horde)

I-3- Répartition topographique de la flore digestive

La flore digestive est répartie tout au long du tube digestif (figure n° 1) : bouche, estomac, petit intestin (duodénum, jéjunum, iléon), gros intestine (côlon avec appendice) et anus. Cette répartition dépend de la capacité des bactéries à survivre et proliférer dans les différents milieux (Berg. 1996).

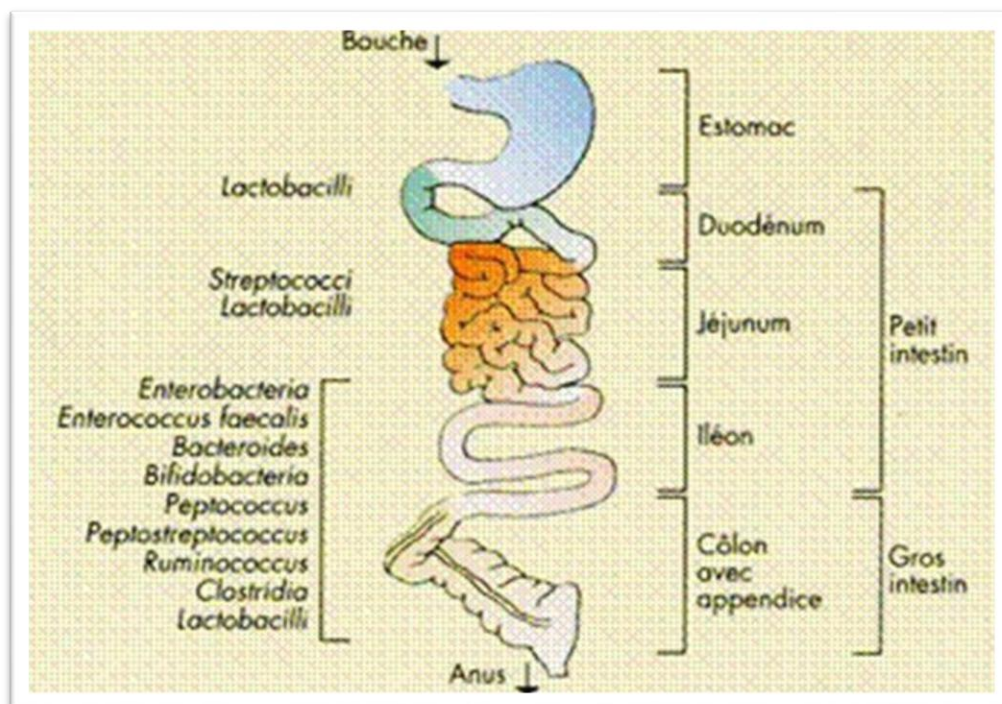


Figure n° 1 : Répartition de la flore digestive (Goulet. 2009)

I-3-1- Les flores buccales et oropharyngées

La cavité orale contient une microflore d'environ 200 espèces bactériennes. La salive contient des bactéries en transit (10^9 germes/ml) issues des surfaces muqueuses tapissant la langue et l'intérieur des joues. Les fentes gingivales et la plaque dentaire fournissent un environnement anaérobie avec de très faibles potentiels d'oxydoréduction, autorisant l'établissement d'une flore anaérobie diverse. La plaque dentaire contient une population bactérienne très dense (10^{11} bactéries/g) (**Berg. 1996**).

I-3-2- La flore gastrique

Au niveau de l'estomac, la plupart de bactéries ingérées sont détruites par l'acidification due à la sécrétion de suc gastrique (le pH descend à 2.5-3.5 et peut même être inférieur à 2). Il n'est donc pas étonnant que leur nombre ne soit que de 10^3 germes/g de contenu. Ce sont principalement des bactéries gram-positives, anaérobies facultatives, appartenant aux genres *Lactobacillus* ou *Streptococcus* qui, contrairement à la majorité des microorganismes retrouvés dans la nourriture, sont des microorganismes résistants à l'acidité (**Tannock. 1995**). La plupart des bactéries retrouvées au niveau gastrique sont considérées comme des microorganismes en transit plutôt que comme des commensaux.

I-3-3- L'intestin grêle (petit intestin)

Dans l'intestin grêle, les principaux facteurs limitant la population bactérienne sont ; la rapidité du transit et le caractère agressif des sécrétions pancréatique et biliaire.

Les bactéries du jéjunum (10^4 germes/g) sont principalement des *Lactobacillus*, des *Bifidobacterium* et des *Streptococcus*. L'iléon est considéré comme une zone de transition entre la microflore relativement faible de la partie supérieure de l'intestin et la microflore colique qui est plus importante (**Berg. 1996**). Comparée avec la partie supérieure de l'intestin, la partie distale, dont le péristaltisme est diminué et les potentiels d'oxydoréduction inférieurs, maintient une microflore plus diversifiée et des populations bactériennes plus importantes. Les bactéries de l'iléon (10^6 à 10^7 germes/g) comprennent non seulement les mêmes bactéries que le jéjunum, avec un plus fort pourcentage de *Bifidobacterium*, mais aussi des *Clostridium* (gram-positives, anaérobies strictes) et les bactéries gram négatives que sont les *Enterobacteriaceae* (aéro-anaérobies facultatives), les *Bactéroïdes* et les *Fusobacterium* (anaérobies strictes) (**Savage. 1977**).

I-3-4- Le gros intestin (colon)

Le colon arbore une flore microbienne très importante (10^{10} à 10^{12} germes/g) composée de bactéries strictement anaérobies, dont les plus importants sont :

- Des Gram-négatives telles que les *Bactéroïdes* et le *Fusobacterium*.
- Des Gram-positives telles que les *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Rimunococcus*, *Peptostreptococcus*, *Peptococcus* et les *Clostridium*.

On y trouve également, mais à des concentrations plus faibles, des bactéries aéro-anaérobies facultatives, Gram-négatives (*Enterobacteriaceae*) ou Gram-positives (*Lactobacillus*,

Streptococcus et *Enterococcus*). Le colon contient d'autres bactéries en quantité notable, par exemple des germes méthanogènes, acétogènes, réducteurs de sulfates, des *Propionibacterium*, des *Staphylococcus* et des *Veillonella* (Gram négative, anaérobie stricte) (**Shanahan. 2002**).

I-3-5- La flore fécale

Dans les fèces, la composition microbienne est prise pour modèle de celle de colon, on distingue la flore dominante et la flore sous dominante. La flore dominante chez l'homme adulte correspond à des populations bactériennes représentant plus de 1 % de la microflore totale. En termes de bactérie cultivables, une population dominante comprend de 10^{10} à 10^{11} unités formant colonies (UFC)/g de selles (**Savage. 1977**).

I-4- La composition classique d'une flore digestive

Différents facteurs exercent une influence sur la composition de la flore intestinale qui s'implante : l'âge gestationnel, le mode d'accouchement, par voie vaginale ou par césarienne, ainsi que l'environnement du lieu de naissance. L'hygiène de plus en plus stricte entourant les accouchements dans les pays à haut niveau de vie est sans doute, responsable d'une moindre colonisation par les bactéries de la flore maternelle par rapport à la colonisation par des bactéries de l'environnement (**Gronlund et al. 1999**).

I-5- Rôle de la flore digestive

La flore intestinale est très certainement importante mais reste très mal connue. Elle intervient dans la dégradation des polysides, la fermentation des oses, la transformation de xénobiotiques, la protéolyse et la formation des acides aminés, la production d'hydrogène fermentaire et sa réutilisation, la production des gaz intestinaux, le métabolisme des acides biliaires, la production de mutagènes, mais aussi et surtout au niveau du développement du système immunitaire intestinal (**Hanson et Yolken. 1999**).

I-5-1- Effet de la flore intestinale

La flore intestinale exerce de nombreux effets notamment sur l'angiogenèse intestinale ou la motricité digestive. D'importants travaux chez les animaux axéniques maintenus en conditions stériles puis colonisés par différentes souches bactériennes ont permis de mettre en évidence ces différents effets (**Hooper. 2004**).

I-5-2- Les métabolites

La diversité des substrats, glucides non digestibles, protéines endogènes et cellules épithéliales, stérols, etc., dégradés et métabolisés par la flore, rend compte de la diversité des espèces bactériennes et de celle des métabolites qu'elles produisent. Ces métabolites sont, pour la plupart, absorbés et métabolisés dans l'organisme. Ils exercent des effets nutritionnels, métaboliques et trophiques, contribuant ainsi au maintien en bonne santé de l'hôte. La toxicité et la capacité fonctionnelle de l'épithélium du côlon dépendent d'un renouvellement rapide et sont contrôlées par des mécanismes cellulaires et moléculaires complexes. Leur perturbation peut entraîner des désordres importants allant de simples troubles du transit intestinal à des

pathologies inflammatoires, voire cancéreuses. Des interactions entre les bactéries de la flore colique et les cellules intestinales impliquent la sécrétion de molécules « signal » par les bactéries, pouvant moduler l'expression de gènes cibles dans l'épithélium intestinal. Le butyrate, produit par la flore colique, est un substrat énergétique essentiel, il module l'expression de nombreux gènes (Goulet. 2009).

I-5-3- la flore intestinale une barrière indispensable

La flore intestinale constitue une « barrière » permettant de limiter la colonisation par des bactéries pathogènes. L'équilibre de la flore intestinale résulte d'interactions microbiennes au sein du microbiote intestinal sous la forme de compétitions pour les substrats nutritifs ou les sites d'adhérence et de modifications de l'environnement intestinal par des produits du métabolisme bactérien : bactériocines, acides organiques, etc. La flore intestinale est donc un biotope majeur, indispensable à l'acquisition et au maintien des fonctions digestives et immunitaires. Elle subit de nombreuses influences contrôlables où elle doit être à tout prix préservée de toute altération dans son équilibre et peut être positivement modulée. Il convient de connaître les circonstances au cours desquelles la flore intestinale peut être altérée et, à l'inverse, comment il est possible de la moduler pour augmenter son potentiel bénéfique (Kailam et al. 1992).

I-6- Facteur d'agression de la flore digestive

Un certain nombre de facteurs thérapeutiques ou diététiques altèrent durablement la flore intestinale.

I-6-1- L'utilisation des traitements anti-acide

Elle altère également la flore notamment dans le cadre du reflux gastro-œsophagien avéré ou malheureusement simplement suspecté devant des douleurs abdominales. L'absence de prokinétiques efficaces a conduit à une augmentation majeure de la prescription d'inhibiteurs de la pompe à protons. Par malheur, l'alcalinisation gastrique supprime l'une des principales barrières à la colonisation par des bactéries de l'environnement, éventuellement pathogènes. Il a été montré que les traitements anti-acides augmentent le risque de diarrhée infectieuse et de pneumonie (Cananiet al. 2008).

I-6-2- Carence en fibres alimentaires

Une alimentation ne comprenant pas ou si peu de fibres alimentaires ne favorise pas l'implantation et surtout le maintien d'une flore équilibrée avec une proportion suffisante de bifides (Goulet. 2009).

I-6-3- Gastroentérite aigue

Une banale gastroentérite aiguë (GEA) virale ou, plus rarement dans nos pays, d'origine bactérienne altère la flore intestinale. La plupart des enfants des pays à haut niveau de vie guérissent rapidement d'une GEA. Cependant, certains développent le classique tableau de diarrhée grave prolongée post infectieuse dont une des composantes est un déséquilibre durable de la flore intestinale avec toutes les conséquences que ses nombreux rôles physiologiques

laissent supposer. Il ne faut sous-estimer aucun de ces facteurs. En raison du rôle de la flore intestinale dans le développement des fonctions immunitaires et dans l'acquisition de tolérance, des modifications durables de celle-ci, notamment en raison d'antibiothérapies répétées, ont forcément un impact même s'il est difficile de le mesurer avec précision (**Goulet. 2009**).

I-6-4- l'antibiothérapie

Qu'elle soit administrée par voie orale ou intraveineuse, en particulier aux phases cruciales d'implantation et de développement d'une flore bifide dominante, toute antibiothérapie doit être parfaitement indiquée et adaptée à la situation, tout particulièrement chez le nouveau-né et le nourrisson. Des travaux suggèrent un lien entre antibiothérapie en période néonatale et asthme (**Alm et al. 2008**). Une étude récente, réalisée chez 1098 enfants atteints de maladie de Crohn (MC) et 6550 contrôles nés entre 1973 et 1997, suggère un lien entre l'administration précoce d'antibiotiques, entre la période néonatale et l'âge de cinq ans et la survenue d'une MC (**Hildebrand et al. 2008**).

I-7- Mode d'action des antibiotiques

Les antibiotiques agissent à l'échelle moléculaire (Figure n° 2) au niveau d'une ou de plusieurs étapes métaboliques indispensables à la vie de la bactérie (**Yala et al. 2001**). Ils agissent par :

I-7-1- Toxicité sélective

Au niveau de la ;

- Synthèse de la paroi bactérienne.
- Membrane cytoplasmique.
- Synthèse des protéines.
- Acides nucléiques.

I-7-2- Inhibition compétitive

Dans ce cas l'antibiotique est un analogue structural, il interfère avec une fonction essentielle à la bactérie (**Le Minor et Veron. 1989**).

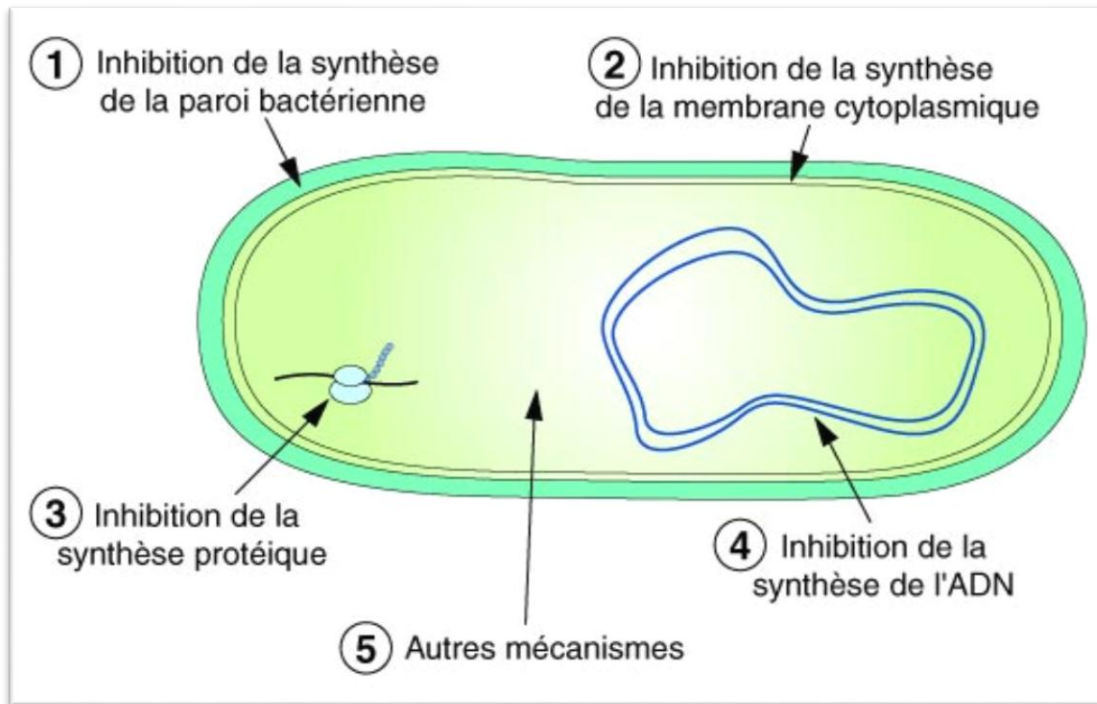


Figure n° 2 : Mode d'action des antibiotiques (www.bacteriologie.net).

I-7-3- La résistance bactérienne aux antibiotiques

La résistance des bactéries aux antibiotiques est connue depuis fort longtemps et son importance clinique survient très peu de temps après le début de l'antibiothérapie.

Elle fait l'objet de publications et de nombreuses revues qui rendent compte de sa constante évolution. Ses mécanismes sont mieux connus grâce aux progrès de la connaissance de la morphologie et du métabolisme bactérien.

I-7-3-1- Résistance naturelle

La résistance naturelle ou intrinsèque correspond à la capacité de résister à la présence d'un antibiotique pour toutes les souches d'une espèce ou d'un genre bactérien. La Société Française de Microbiologie (SFM) définit la résistance naturelle comme la caractéristique d'une espèce bactérienne qui se traduit par des concentrations minimales inhibitrices (CMI) supérieures à la concentration critique des tests de sensibilité pour l'antibiotique concerné.

I-7-3-2- Résistance acquise

On oppose à la résistance naturelle, propriété d'espèce ou de genre, la résistance acquise qui est une propriété de souche. Cette dernière correspond à la capacité de supporter une concentration d'antibiotique beaucoup plus élevée que celle supportée par les autres souches de la même espèce. Elle peut s'acquérir soit par mutation chromosomique, soit par acquisition de matériel génétique exogène (**Prescott. 2000**).

I-7-3-2-1- Résistance par mutation chromosomique

Ce phénomène spontané est rare et n'explique qu'une faible partie des résistances rencontrées en clinique. L'antibiotique n'induit pas la mutation mais si celle-ci survient l'antibiotique favorise la souche résistante qui est alors sélectionnée. La diffusion de ce type de résistance est liée à la diffusion de la souche mutante. Généralement, l'augmentation de résistance se fait progressivement par paliers. Cependant, on peut rencontrer des cas où une seule mutation chromosomique aboutit à une élévation de résistance très importante ; par exemple, la CMI vis à vis de la streptomycine peut être multipliée par 1000 par une unique mutation chromosomique (**Prescott et al. 2000**).

La fréquence d'apparition des mutations est fonction de l'antibiotique. On observe les plus grandes fréquences de mutation pour la streptomycine et la rifampicine.

I-7-3-2-2-Résistance par acquisition de matériel génétique exogène

Ce type de résistance procède de l'acquisition de gènes de résistance par l'intermédiaire d'un plasmide ou de transposons à la faveur de 3 mécanismes d'échange possibles : conjugaison, transformation ou transposition. Généralement, on observe une augmentation brusque de résistance plutôt qu'une augmentation par paliers du niveau de résistance.

- ✓ **Conjugaison** : Dans le phénomène de conjugaison, une bactérie donneuse transmet à une bactérie receveuse une copie de son plasmide porteur de gènes de résistance (appelé plasmide R ou facteur R). Ce mécanisme peut s'effectuer entre bactéries de la même espèce, au sein d'un même genre ou parfois entre bactéries de genres différents d'où son efficacité. Par exemple, *Staphylococcus aureus* peut échanger du matériel génétique avec *E.coli*. Un plasmide peut contenir différents gènes de résistance. L'utilisation d'un seul des antibiotiques contre lesquels le plasmide est efficace permet alors sa sélection et son maintien dans son intégralité.
- ✓ **Transformation** : La transformation est le résultat d'un réarrangement de séquences d'ADN échangées entre 2 bactéries. On peut alors obtenir de nouveaux gènes de résistance. Ce processus se fait généralement entre bactéries de genre proche car il doit y avoir une forte analogie entre les séquences nucléotidiques pour permettre la recombinaison.
- ✓ **Transduction** : Dans la transduction, un virus bactériophage incorpore une séquence d'ADN d'une bactérie et la transmet à une autre bactérie. Du fait de la spécificité des bactériophages, ce phénomène n'a lieu que pour les bactéries de la même espèce (**Prescott. 2000**).

I-7-4- Mécanismes de résistance

I-7-4-1-Perméabilité de l'agent antimicrobien affectée

Une perméabilité affectée peut être due à l'incapacité de l'agent antimicrobien à entrer dans la cellule bactérienne ou alternativement à un export actif de l'agent hors de la cellule (**Camberlein. 2013**).

I-7-4-2-Inactivation de l'agent antibactérien

La résistance est souvent le résultat de la production d'une enzyme qui est capable d'inactiver l'agent antimicrobien (**Mayer. 2013**).

I-7-4-3-Altération de la cible

Une résistance peut apparaître suite à l'altération de la cible de l'agent antimicrobien (**Camberlein. 2013**).

I-7-4-4-Remplacement de la voie sensible

Une résistance peut résulter de l'acquisition d'une nouvelle enzyme qui remplace l'enzyme sensible à l'agent antimicrobien (**Mayer. 2013**).

Chapitre II : Présentation de *Artemisia herba alba* et *Pistacia lentiscus L* et l'aromathérapie

II-1-Introduction

Pendant des millénaires, l'utilisation des plantes médicinales fut le principal recours pour guérir l'homme. Cette utilisation est généralement adaptée aux pathologies légères, en visant un traitement symptomatique.

On les utilise aussi bien en médecine classique qu'en phytothérapie : elles présentent en effet des avantages dont les médicaments conventionnels sont souvent dépourvus (Gilles. 1976. Iserin. 2001).

II-2- *Artemisia herba alba*

II-2-1- Définition

Le genre *Artemisia* est un membre d'une grande variété de plante appartenant à la famille des *Asteraceae* (*Compositae*). Plus de 300 différentes espèces de ce genre se trouvent principalement dans les zones arides et semi arides d'Europe, d'Amérique, l'Afrique du nord ainsi qu'en Asie. Les espèces d'*Artemisia* sont largement utilisées comme plantes médicinales en médecine traditionnelle (Proksch. 1992).

II-2-2- Classification

Selon (Julve., 2015).

- **Règne** : plantae
- **Embranchement** : *angiospermes*
- **Classe** : *dicotyledones*
- **Ordre** : *asterales*
- **Famille** : *asteraceae*
- **Genre** : *Artemisia*.
- **Espèce** : *herba alba*.

II-2-3- Description botanique

Artemisia herba alba est une plante vivace de 30-50 cm de long, qui se caractérise par une odeur de thymol, très verdoyante et avec de jeunes branches tomenteuses. Les feuilles sont courtes, généralement pubescentes, argentées, de natipartites. Les fleurs sont hermaphrodites, emballés dans des petits capitules, les fruits sont des akènes (figure n°3). Sa croissance végétative a lieu à l'automne, la floraison commence en juin et se développe essentiellement en fin d'été (Gharabi et al. 2008)

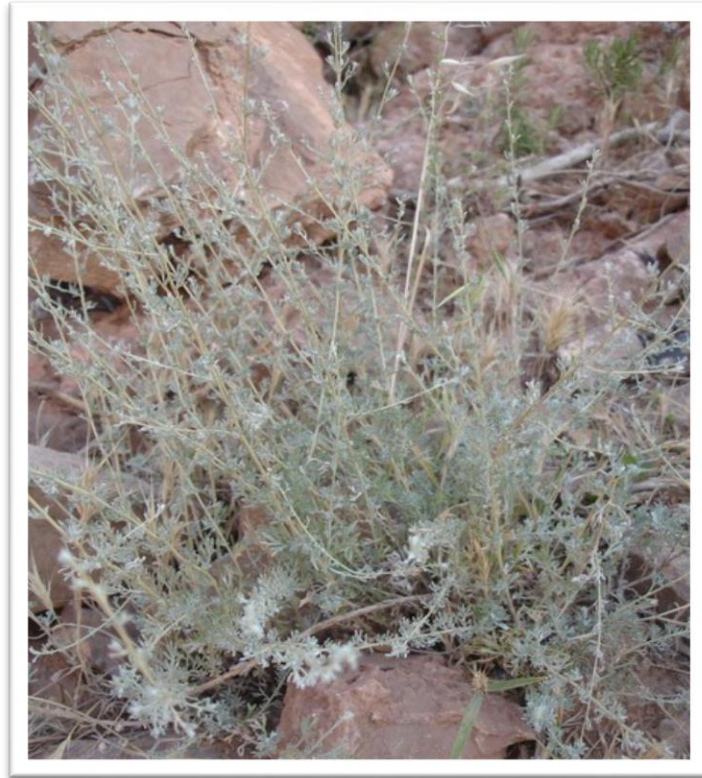


Figure n° 3 : *Artemisia herba alba* (Algeria native plants.net)

II-2-4- Répartition de la plante en Algérie

En Algérie, *Artemisia herba alba*, connue sous le nom de « *Chih* » ou encore appelé *semen-contra* de barbarie, couvre près de six millions d'hectares dans les steppes, elle se présente sous forme de buissons blancs, laineux et espacés (**Boutekjnet. 1987**).

II-3- *Pistacia lentiscus* L

II-3-1- Définition

Le genre *Pistacia* est une variété de plante appartenant à la famille des Anacardiaceae (**Quezel et Santa. 1962**). Parmi les espèces du genre *Pistacia*, le *Pistacia lentiscus* L est un arbrisseau très commun dans notre pays (**Mitcheh. 1986. Baudiere et al. 2002**).

II-3-2- Classification

(Judd et al. 2002. Lieutaghi. 2004. Yaaqobi et al. 2009).

- Règnes : plantae.
- Embranchement : *spermatophyta*.
- Classe : *dicotyledones*.
- Ordre : *sapindales*.
- Famille : *Anacardiaceae*.
- Genre : *Pistaciaceae*.
- Espèce : *lentiscus*.

II-3-3- Description botanique

Arbrisseau dioïque thermophile de 1 à 3 mètres, à odeur résineuse forte et à écorce lisse et grise, les feuilles persistantes, composées, alternes pourvues d'un pétiole ailé, les fleurs en grappes spiciformes denses, naissant 1 ou 2 à l'aisselle d'une feuille et égalant au plus la longueur d'une foliole. Le fruit petit, subglobuleux, apiculé, rouge (figure n°4) puis noir à la maturité (Yahya. 1992. Iserin. 2001. More et White. 2005).



Figure n° 4 : *Pistacia lentiscus* L. (algerianativeplants.net)

II-3-4- Répartition en Algérie

En Algérie, le *lentisque* se trouve sur le long du tell et dans les zones forestières (**More et White. 2005**).

II-3-5- Produits et dérivées à base de la plante

D'après (**Seigue. 1985**), les principaux produits dérivés du *Pistacia lentiscus L* et leur utilisation sont décrites ;

- **Bois** : pour sa robustesse et la finesse de sa texture, le bois de cette espèce est très apprécié en ébénisterie.
- **Résine** : Des branches et du tronc exsude naturellement ou par incision une résine jaune-claire fortement aromatique qui durcit au contact de l'air qui est appelée mastic ou gomme mastic d'où son nom commun d'arbre à mastic, généralement la production est d'environ 4 à 5 kilos par arbuste.
- **Essence de Mastic** : après distillation du mastic est récupérée une essence qui entre dans la confection de parfums, produits cosmétologiques et pharmaceutiques, de vernis de grande qualité recherché par les peintres œuvrant à la peinture à l'huile et aussi dans l'industrie photographique.
- **Huile de lentisque** : du fruit comestible est extraite une huile qui autrefois était couramment utilisée pour l'alimentation, l'éclairage et elle entrait aussi dans la confection de savons. L'huile est produite à l'Est de l'Algérie, dans les zones notamment côtière (El Milia, Skikda), où l'espèce abonde. Un procédé traditionnel est utilisé à cet effet : Les fruits atteignent leur maturité vers la fin d'été début de l'automne. Les baies prennent alors une coloration noire au lieu du rouge. Les baies sont récoltées à la main, macérées dans de l'eau chaude et puis écrasés à l'aide d'une presse. Des baies s'exultent un liquide épais de couleur jaune vert. L'huile est récupérée par décantation.
- **Essence des feuilles et rameaux** : de ces parties est extraite une huile essentielle qui est utilisée en aromathérapie et phytothérapie pour ses propriétés décongestionnantes, prescrite aussi pour traiter les problèmes veineux dont les hémorroïdes.

II-4- Les huiles essentielles

II-4-1- Définition

Les huiles essentielles sont des substances huileuses, volatiles et odorantes. Présentes dans les plantes aromatiques et localisées dans les fleurs, les feuilles, les fruits, les graines, l'écorce et les racines (**Meyer. 1989**). Ces huiles essentielles sont extraites par divers procédés dont l'entraînement à la vapeur d'eau et l'hydro-distillation (**Oakes et al. 2001**), par pressage ou incision des végétaux qui les contiennent. Elles se forment dans un grand nombre de plantes comme sous-produits du métabolisme secondaire (**Angus et al. 1976**), et sont très utilisées dans

l'industrie des produits cosmétiques, pharmaceutiques et agro-alimentaires (**Eckert et Knutson. 1993**). Elles sont par ailleurs responsables de l'odeur caractéristique de la plante (**Bruneton. 1993**).

II-4-2- Propriétés physiques et chimiques des huiles essentielles

II-4-2-1- Propriétés physiques

Les huiles essentielles sont liquides et volatiles à température ambiante, ce qui les différencie des huiles fixes. Elles ne sont que très rarement colorées et leur densité est en générale inférieure à celle de l'eau. Elles ont un indice de réfraction élevé, elles sont solubles dans les solvants organiques usuels (**Bruneton. 1993**), liposolubles et entraînables à la vapeur d'eau (**Houchit. 1992**). Leur point d'ébullition varie de 160°C à 240°C (**Purdini et Lucheroni. 1997**).

Elles sont très altérables, sensibles à l'oxydation, donc de conservation limitée. Dissolvent les graisses, l'iode, le soufre, le phosphore et réduisent certains sels (**Legrand. 1978**).

II-4-2-2- Propriétés chimiques

Les plantes vertes sont de véritables petites usines chimiques (**Delaveau et al. 1985**).

Les cellules végétales sont capables, en dehors de la synthèse des composés fondamentaux de la lumière vivante (les protéines, les lipides et les sucres), de coordonner les multiples réactions chimiques conduisant à l'élaboration des essences (**Garnero. 1991**).

Sur le plan chimique les huiles essentielles sont des mélanges de structure extrêmement complexe, pouvant contenir plus de 300 composés différents : les terpènes ; les composants aromatiques ; les composants d'origines diverses ; notion chémotype ; aldéhydes ; esters ; cétones ; lactones. Ces substances sont des molécules très volatiles appartenant pour la grande majorité à la famille des terpènes, tels que les mono-terpènes et les sesquiterpènes (**Croteau et al. 2000**).

II-4-3- Techniques d'extractions

Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales. En général le choix de la méthode d'extraction dépendra de la nature du matériel végétal à traiter (graines, feuilles, rameaux, racines, etc...), de la nature des composés, le rendement en huiles essentielles et la fragilité de certains constituants aux températures élevées.

II-4-3-1- La distillation

La technique d'extraction des huiles essentielles utilisant l'entraînement des substances aromatiques grâce à la vapeur d'eau est de loin la plus utilisée à l'heure actuelle. La méthode est basée sur l'existence d'un azéotrope de température d'ébullition inférieure aux points d'ébullition des deux parties, l'huile et l'eau (**Franchomme et Penoel. 1990**).

Il existe précisément trois différents procédés utilisant ce principe :

II-4-3-1-1- L'hydro-distillation

Il s'agit de la méthode la plus simple et de ce fait, la plus anciennement utilisée. Le matériel végétal est immergé directement dans un alambic rempli d'eau et placé sur une source de chaleur. Le tout est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées dans un réfrigérant et l'huile essentielle se sépare de l'hydrolat par simple différence de densité. Les huiles essentielles étant plus légères que l'eau, elles surnagent au-dessus de l'hydrolat (figure n° 5)

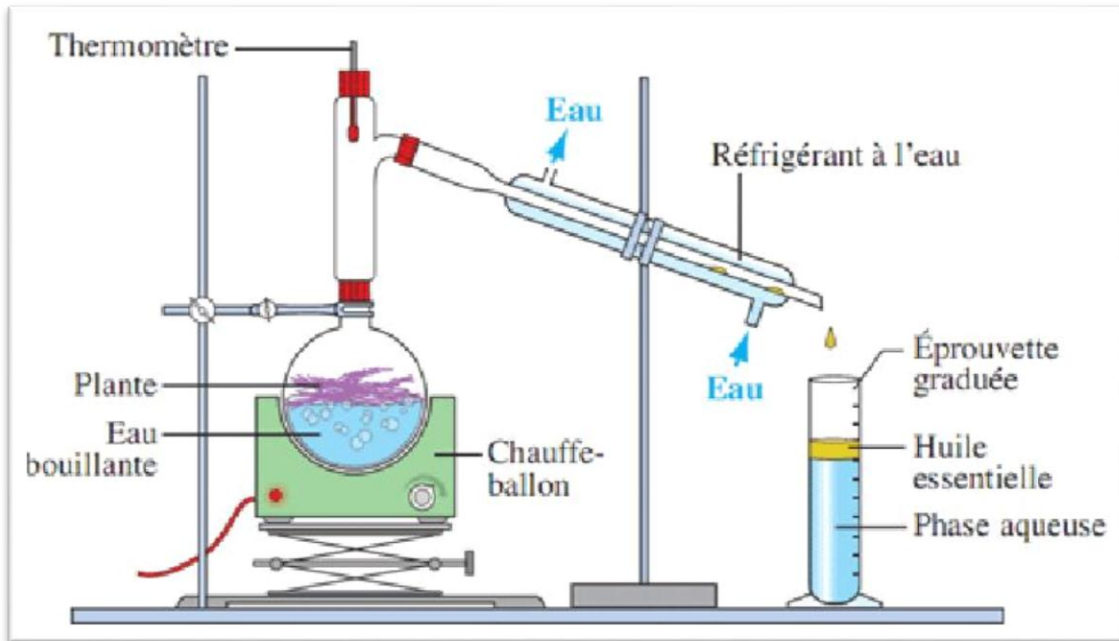


Figure n° 5 : Extraction par hydro-distillation (Goulet. 2009)

II-4-3-1-2- Distillation par entrainement à la vapeur d'eau

Dans ce type de distillation, le matériel végétal ne macère pas directement dans l'eau, il est placé sur une grille perforée au travers de laquelle passe la vapeur d'eau. La vapeur endommage la structure des cellules végétales et libère ainsi les molécules volatiles qui sont ensuite entraînées vers le réfrigérant. Cette méthode apporte une amélioration de la qualité des huiles essentielles en minimisant les altérations hydrolytiques (Franchomme et Penol. 1990).

II-4-3-1-3- Hydro-diffusion

Cette technique, relativement récente, est particulière. Elle consiste à faire passer du haut vers le bas et à pression réduite, la vapeur d'eau au travers de la matrice végétale.

L'avantage de cette méthode est d'être plus rapide et donc moins dommageable pour les composés volatils. Cependant, les huiles essentielles obtenues avec ce procédé contiennent des composés non volatils, ce qui lui vaut une appellation spéciale « essence de percolation » (Franchomme et Penol. 1990. Richard. 1992).

La plupart des huiles essentielles sont obtenue par distillation et entrainement à la vapeur d'eau.

II-4-3-2- extraction par micro-ondes

Au début des années 1990 est apparue une toute nouvelle technique appelée hydro-distillation par micro-onde sous vide. Dans ce procédé, la matrice végétale est chauffée par micro-onde dans une enceinte close et dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle. Les composés volatils sont entrainés par la vapeur d'eau formée à partir de l'eau propre à la plante (figure n°6). Ils sont ensuite récupérés à l'aide des procédés classiques de condensation, refroidissement et décantation. Ce procédé permet un gain de temps et d'énergie (Mengel *et al.* 1993).

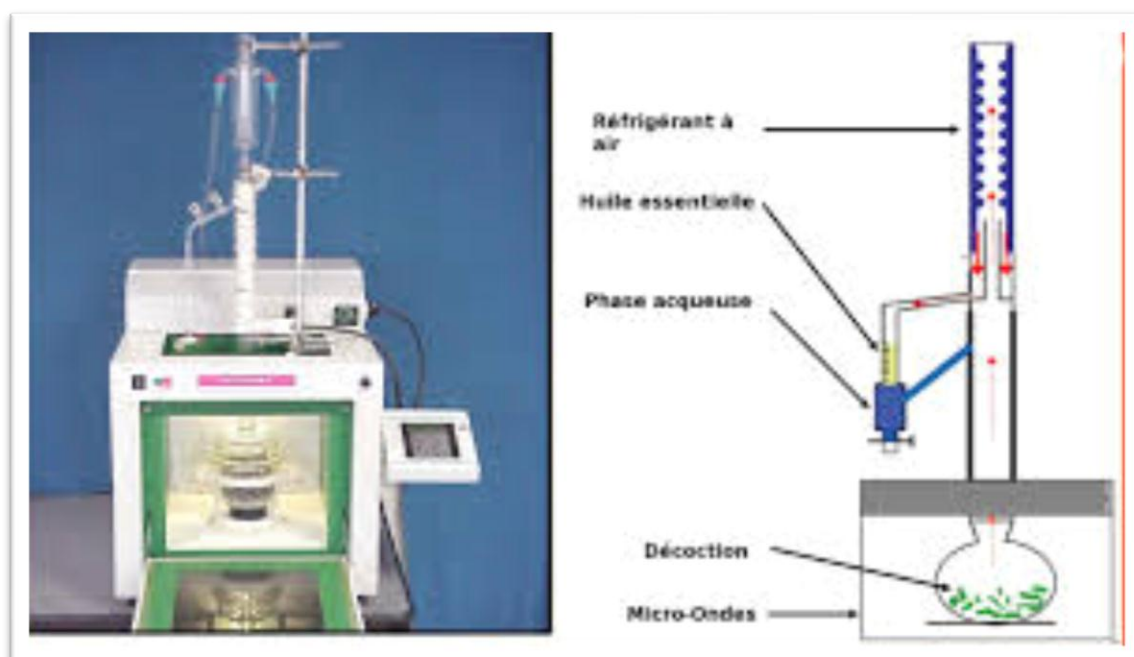


Figure n° 6 : Extraction par micro-onde (Mengel *et al.* 1993)

II-4-3-3- Extraction par solvants

Cette extraction est basée sur le fait que les huiles essentielles sont solubles dans la plupart des solvants organiques. L'extraction se fait dans des extracteurs de construction variée, en continu, semi continu ou en discontinu. Le procédé consiste à épuiser le matériel végétal par un solvant à bas point d'ébullition et qui, par la suite, sera éliminé par distillation sous pression réduite. L'évaporation du solvant donne un mélange odorant de consistance pâteuse. L'extraction par les solvants est très couteuse à cause du prix de l'équipement et de la grande consommation des solvants (shellie *et al.* 2004).

Les solvants les plus utilisés à l'heure actuelle sont l'hexane, le cyclohexane, l'éthanol, le dichlorométhane et l'acétone (Legrand. 1993. Dapkevicius *et al.* 1998. Kim *et Lee.* 2002).

II-4-3-4- Extraction par les corps gras

La méthode d'extraction par les corps gras est utilisée en fleurage dans le traitement des parties fragiles de plantes telles que les fleurs, qui sont très sensibles à l'action de la température. Elle met à profit la lipo-solubilité des composants odorants des végétaux dans les corps gras. Le principe consiste à mettre les fleurs en contact d'un corps gras pour le saturer en essence végétale. Le produit obtenu est une pommade florale qui est ensuite épuisée par un solvant qu'on élimine sous pression réduite. Dans cette technique, on peut distinguer l'enfleurage où la saturation se fait par diffusion à la température ambiante des arômes vers le corps gras et la digestion qui se pratique à chaud, par immersion des organes végétaux dans le corps gras (Cordero et al. 2007).

II-4-3-5- Extraction au CO₂ supercritique

L'originalité de cette technique d'extraction réside dans le type de solvant employé : le CO₂ supercritique. Au-delà du point critique (P=73,8 bars et T= 31,3°C), le CO₂ possède des propriétés intermédiaires entre celles des liquides et celles des gaz, ce qui lui confère un bon pouvoir d'extraction, et qui est plus facilement modulable en jouant sur les conditions de température et de pression. Cette technique présente énormément d'avantage. Tout d'abord, le CO₂ supercritique est un solvant idéal puisqu'il est naturel, inerte chimiquement inflammable, non toxique, sélectif, aisément disponible et peu couteux. De plus, il s'élimine facilement de l'extrait sans laisser de résidus (figure n°7) (Pellerin. 1991).

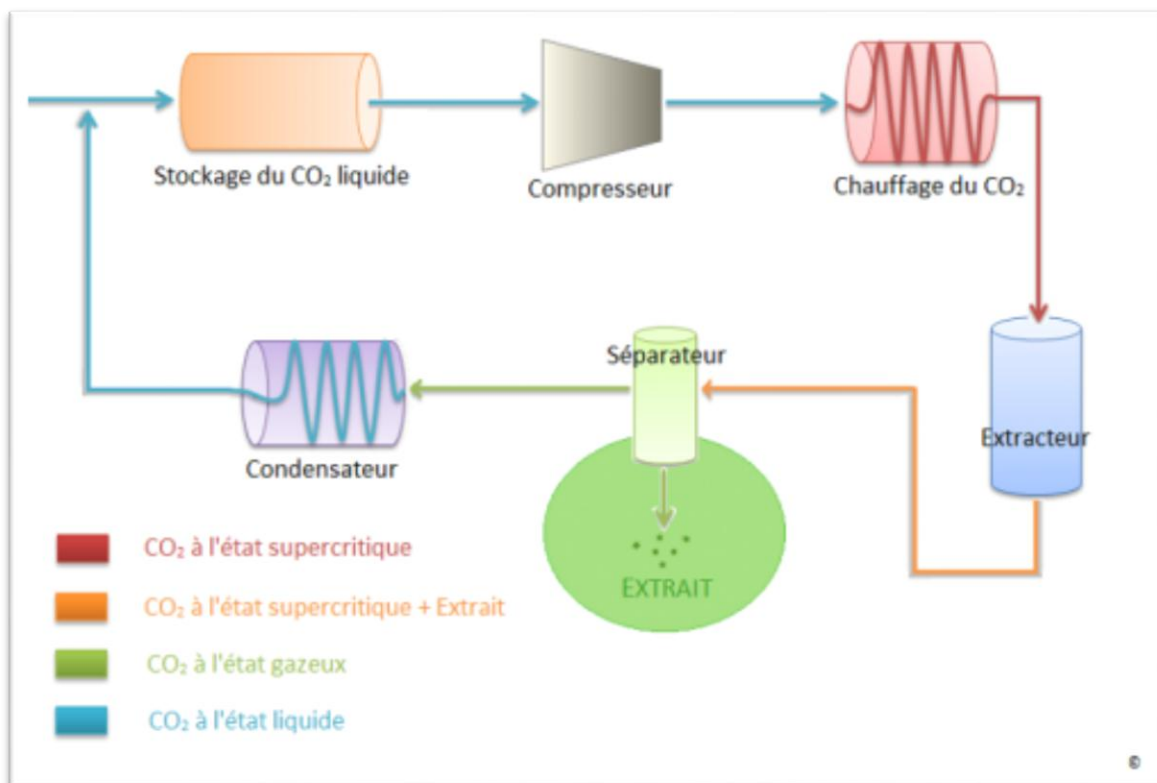


Figure n° 7 : Extraction par CO₂ supercritique (Pellerin. 1991)

II-4-3-6- Expression à froid

L'expression à froid est réservée à l'extraction des composés volatils dans les péricarpes. Il s'agit d'un traitement mécanique qui consiste à déchirer les péricarpes riches en cellules sécrétrices (**Basil et al. 1998**).

Elle constitue le plus simple des procédés, mais ne s'applique qu'aux agrumes dont l'écorce des fruits comporte des poches sécrétrices d'essences. Ce procédé consiste à broyer, à l'aide de presses les zestes frais pour détruire les poches afin de libérer l'essence. Le produit ainsi obtenu porte le nom d'essence, car il n'a subi aucune modification chimique (**Roux. 2008**).

II-4-4- Méthodes d'analyses des huiles essentielles

La détermination de la composition chimique des huiles essentielles est une étape importante malgré le développement des méthodes de séparation et d'identification. Elle demeure une opération délicate nécessitant la mise en œuvre de diverses techniques.

II-4-4-1- Chromatographie

II-4-4-1-1- Chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince ou CCM est une méthode analytique utilisée pour la séparation et l'identification rapides des constituants d'un extrait donné, elle repose sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant ou un mélange des solvants, la phase stationnaire qui peut être soit une couche mince de gel de silice, d'alumine ou de cellulose (**Bengrba. 2008**).

II-4-4-1-2- chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse ou CPG est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition (**Arpino et al. 1995**). C'est la méthode la plus utilisée dans le domaine des huiles essentielles. Cette méthode est constituée de trois modules : un injecteur, une colonne capillaire dans le four et un détecteur (**Bouchonnet et Libong. 2002**).

II-4-4-2- Spectroscopie

II-4-4-2-1- Infrarouge

La spectroscopie IR est utilisée en général pour identifier les groupements fonctionnels d'une molécule. Cette méthode est très employée dans les laboratoires de chimie. Le domaine de fréquence le plus couramment utilisé s'entend de 4000cm^{-1} à 6000cm^{-1} .

II-4-4-2-2- Résonance magnétique nucléaire

La résonance magnétique nucléaire ou RMN est une technique utilisée pour l'analyse des structures de nombreuses molécules chimiques. Cette méthode repose essentiellement sur le phénomène de magnétisme. En effet, les noyaux de certains atomes possèdent un moment magnétique nucléaire, c'est à dire qu'ils se comportent comme des aimants microscopiques caractérisés par une grandeur quantique appelée le spin (**Bengrba. 2008**).

II-4-4-2-3- Spectroscopie de masse

La spectroscopie de masse permet l'identification et la quantification des composés. Il existe de nombreux types de spectromètres de masse : tous ont en communs trois éléments : une source, un analyseur et un détecteur (**Bouchennet et Libong. 2002**).

II-4-4-3- Couplage CPG/SM

Le couplage chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse est aujourd'hui une des techniques parmi les plus utilisées de la chimie analytique. La principale difficulté rencontrée lors de ce couplage est due à la grande différence de pression. En effet, la spectrométrie de masse requiert un niveau de pression très bas, alors que la chromatographie en phase gazeuse se déroule à un niveau de pression plus élevé (**Cavalli. 2002**). Le bombardement de substance par un faisceau d'électrons d'énergie de l'ordre de 70eV provoque leur ionisation et leur fragmentation. Les fragments ioniques positifs forment alors le spectre de masse caractéristique du composé. Les spectres de masse ainsi obtenus sont comparés avec ceux des produits de référence contenus dans des bibliothèques informatisées contenant plusieurs milliers de spectres (**Bouchennet et Libong. 2002**).

II-4-5- composition chimique des huiles essentielles de *Artemisia herba alba* et *Pistacia lentiscus* L

II-4-5-1-*Artemisia herba alba*

Plusieurs métabolites secondaires ont été isolés et identifiés de l'*Artemisia herba alba* dont les plus importants sont les sesquiterpènes lactones tels que les eudesmanolides et les germes acranolides (**Papoutis et al. 2006**). Les flavonoïdes détectés dans l'armoise montrent aussi une diversité structurale allant des flavonoïdes communs (flavones glycosides et flavonols) jusqu'aux flavonoïdes méthylés qui sont très inhabituel. Les flavonoïdes glycosides comprennent les *O-glycosides* tels que quercitine-3-glucoside et des flavones *C-glycosides*, qui sont rares dans le genre *Artemisia*, ainsi que dans l'ensemble des Astéracée (**Tóth et al. 2007. Alkhatib et al. 2010**).

En plus des sesquiterpènes lactones et des flavonoïdes l'analyse phytochimique a montré que la composition des huiles essentielles de l'*Artemisia herba alba* est riche en monoterpènes, triterpènes, pentacycliques, santonines, coumarines et tanins (**Matteucci et Giampietro. 2008**).

II-4-5-2- *Pistacia lentiscus* L

La chimie de la plante est relativement peu étudiée. La plante est connue pour contenir une huile essentielle et fixe (**Grosjean. 2007**), une huile grasse (**Charef et al. 2008**), des tanins condensés et hydrolysables (**Abbas et Boudriche. 2007**), des glycosides flavonoïques (**Vaya et Mahmood. 2006**), des anthocyanes (**Longo et al. 2007**), une résine « mastic dechio » (**Leonti et al. 2001**), et des triterpènes (**Atmani et al. 2009**).

De la résine extraite du tronc et des tiges de *Pistacia lentiscus* L est isolés une huile essentielle, riche en monoterpènes en quantité majoritaire, des monoterpénols et des

sesquiterpènes en quantité moyenne, et des esters terpéniques en quantité mineure. (**Baudoux. 2003. Grosjean. 2007**)

Des feuilles de *Pistacia lentiscus* L ont été isolés des tanins proanthocyanidiques et galliques, des glycosides flavonoïdes et des anthocyanes, et des dérivés à noyau gallique et quinique (**Longo et al. 2007**).

Des baies est extraite par expression une huile végétale dont la composition demeure peu étudiée.

II-4-6- Mode d'action des huiles essentielles

Le mode d'action des huiles essentielles dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne. Cela peut induire un changement de conformation de la membrane, une perturbation chémoosmotique et une fuite d'ions (K⁺) (**Cox et al. 2000. Souza et al. 2006**).

Certains composés phénoliques des huiles essentielles interfèrent avec les protéines de la membrane des micro-organismes comme l'enzyme ATP ase, soit par action directe sur la partie hydrophobe de la protéine, soit en interférant dans la translocation des protons dans la membrane prévenant la phosphorylation de l'ADP (**Pavel et al. 2009**).

Une inhibition de la décarboxylation des acides aminés chez *Enterobacter aerogenes* a aussi été rapportée (**Wendakoon et Sakaguchi. 1995**). Les huiles essentielles peuvent aussi inhiber la synthèse de l'ADN, de l'ARN, des protéines et des polysaccharides (**Malecky. 2007**).

D'autres auteurs pensaient que l'activité inhibitrice de ces composés serait due à leur affinité avec les groupements SH impliqués dans la division cellulaire (**Rhayour. 2002**).

II-4-7- Rôle des huiles essentielles

II-4-7-1- Rôle physiologique

Le rôle physiologique des huiles essentielles est aujourd'hui mis en lumière par les progrès scientifiques, et on distingue :

II-4-7-1-1- Propriétés antiseptiques

Les huiles essentielles s'affairement par endroit supérieur aux antibiotiques classique parce qu'elles ont une action bactériolytique (**Bezager et Coll. 1992**).

II-4-7-1-2- Propriétés de défloculations

Les huiles essentielles sont défloculantes (solvant), c'est-à-dire qu'elles collent aux mucosités visqueuses en cristallisant (noyaux durs issus des métabolismes et engendrent, par les excès de viande et d'amidon, la plupart des maladies) (**Bernadet. 1983**).

II-4-7-1-3- Propriétés de diurèses

Les huiles essentielles font fonctionner les 4 grandes émonctoires « peau avec ses 3 glandes, reins, poumons et intestins ». Facilitant le drainage des déchets et résidus humoraux solubles vers leurs émonctoires spécialisés.

II-4-7-2- Rôle thérapeutiques

Les huiles essentielles possèdent des propriétés thérapeutiques variées :

- Remèdes aux problèmes respiratoires.
- Diminuent la tension nerveuse.
- Améliorent la circulation sanguine.
- Aident le corps à traiter les impuretés.
- Soulagent la nervosité et les douleurs rhumatismales (**Lemire. 2000**).

II-4-7-3- Activité biologique

Les huiles essentielles sont connues pour être douées de propriétés antiseptiques étant microbiennes. Beaucoup d'entre elles ont des propriétés antitoxiques, antivenimeuses, antivirales, anti oxydantes, antifongiques, antibactériennes et antiparasitaires. Plus récemment on leur reconnaît également des propriétés anticancéreuses (**Valnet. 2005**).

II-4-7-3-1- Activité antioxydante

Le pouvoir antioxydant de ces huiles est développé comme substitut dans la conservation alimentaire. Ce sont surtout les phénols qui sont responsables de ce pouvoir (**Richard. 1992**).

Des études de l'équipe constituant le laboratoire de recherche en science appliquées à l'alimentation (RESALA) de l'INRS-IAF, ont montré que l'incorporation des huiles essentielles directement dans les aliments ou l'application par vaporisation en surface de l'aliment contribuent à le préserver des phénomènes d'oxydation. (**Caillet et Lacroix. 2007**).

II-4-7-3-2- Activité antifongique

Dans le domaine phytosanitaire et agroalimentaire, les huiles essentielles ou leurs composés actifs pourraient également être employés comme agents de protection contre les champignons phyto-pathogènes et les microorganismes envahissant les denrées alimentaires.

Il semble que les huiles essentielles extraites de certaines plantes aromatiques ont un rôle important dans notre vie soit physiologique ou bien thérapeutique, sans oublier le rôle biologique de ces huiles (inhibiteurs des germinations et protecteurs des plantes des prédateurs insectes et champignons) (**Lis-Balchin. 2002**).

II-4-7-3-3- Activité antibactérienne

Du fait de la variabilité des quantités et des profils des composants des huiles essentielles il est probable que leur activité antimicrobienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais a plusieurs sites d'action au niveau cellulaire (**Carson et al. 2002**). De façon générale, il a été observé, une diversité d'actions toxiques des huiles essentielles sur les bactéries comme la perturbation de la membrane cytoplasmique, la perturbation de la force motrice de proton, fuite d'électron et la coagulation du contenu protéique des cellules (**Davidson. 1997**).

Le mode d'action des huiles essentielles dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leurs propriétés hydrophobes qui leur permettent de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane bactérienne. Cela peut induire un changement de conformation de cette dernière (Cox et al. 2000. Carson et al. 2002). Une inhibition de la décarboxylation des acides aminés chez *Enterobacter aerogenes a* aussi été rapportés (Wendakoon et Sakaguchu. 1995).

Les huiles essentielles peuvent aussi inhiber la synthèse de l'ADN, l'ARN, des protéines et des polysaccharides (Cox et al. 1991).

Belletti et al. 2004 et Fisher et al. 2007 ont démontré que les huiles essentielles de *citrus* sont efficaces contre les bactéries pathogènes, les spores bactérienne, mais également sur certaines bactéries responsables de toxi-infection alimentaire telles que : *Mycobacterium jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *E.coli O157 :H7*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella thyphimurium* et *Acrobacter butzeleri*.

II-4-8- Domaine d'utilisation des huiles essentielles

II-4-8-1- Industrie cosmétique

L'utilisation courante d'une huile essentielle en droguerie, savonnerie, parfumeries, met en jeu des produits modifiés dont les propriétés olfactives sont plus importantes que la pureté de l'essence.

II-4-8-2- Industrie pharmaceutique

La connaissance de la structure chimique et de modalités d'action, conduira rapidement l'industrie pharmaceutique, à préparer des synthèses a activé identique à celle des agents extraits des plantes.

II-4-8-3- Industrie agro-alimentaire

Les huiles essentielles sont souvent utilisées dans les arômes alimentaires sous forme d'essence concentrée au 1/5^e ou 1/10^e. D'après le même auteur, l'usage des huiles essentielles comme ingrédient aromatisants est un élément fondamental et traditionnel de la formulation des arômes. En plus du fait que les huiles essentielles entrent bien dans le cadre de la définition des arômes naturels. Leur composition chimique est dans la majorité des cas d'une grande complexité, autant que celle des arômes authentiques eux- même. Et leur présence apporte un élément de perfectionnement, d'harmonisation permettant de contribuer à la qualité de la reproduction de l'arôme que l'on veut imiter (Benzeggouta. 2005).

II-4-9- Toxicologie des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont présentées, généralement comme « sans danger ». Mais ces substances naturelles sont aussi des composés puissants (Degryse et al. 2008).

Par leur composition chimique complexe, les huiles essentielles doivent être utilisées avec une extrême prudence, du fait qu'elles peuvent présenter de très graves dangers lors d'une utilisation aléatoire autonome (Benzeggouta. 2005).

Les effets toxiques des huiles essentielles varient considérablement selon leur nature (**Traoré, 2006**). Certaines huiles essentielles se révèlent cytotoxiques.

Chapitre III : Matériels et méthodes

III-1- Objectif du travail

Les huiles essentielles sont connues pour leur pouvoir inhibiteur contre les bactéries pathogènes et multirésistantes (Tassou et Nychas. 1995). C'est dans ce contexte que nous nous sommes penchés sur l'efficacité des plantes en exploitant les huiles essentielles des feuilles et rameaux de *Artemisia herba alba* et *Pistacia lentiscus L.*

Notre étude consiste à :

- Isoler et identifier des bactéries de la flore digestive relativement résistantes aux antibiotiques.
- Etude de l'activité anti-microbienne des huiles essentielles de *Artemisia herba alba* et *Pistacia lentiscus L* sur les bactéries multirésistantes de la flore digestive.

III-2- Bactéries de choix

Le tube digestif humain héberge 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. Certaines espèces sont dominantes (concentration supérieure à 10^9 bactéries/gramme de selle), alors que d'autres sont sous-dominantes (concentration inférieure à 10^8 bactéries/gramme de selle). 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. Polymorphe, elle contient des entérobactéries appartenant aux genres *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Staphylococcus*, *Morganella*, *Enterococcus*, *Pseudomonas* et autres germes.

Dans notre expérimentation les bactéries étudiées sont : *Citrobacter brakii*, *E.Coli G01*, *Morganella morganii*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxycota*, *Proteus mirabilis*, *E. Coli G02* et *Escherichia hermanii*.

III-3- Origine des bactéries

Les bactéries ont été isolées à partir de la matière fécale des malades hospitalisés au niveau du service de la médecine interne de l'EPH d'Ain Tedles Wilaya de Mostaganem.

III-4- Isolement et identification des bactéries

Les échantillons des selles prélevés sont traités au niveau du service de coprologie de laboratoire d'EPH d'Ain Tedles.

III-4-1- Isolement

Pour cela, on utilise plusieurs milieux. Ceux-ci sont ensemencés dans des conditions d'asepsie par la méthode des quadrants, à partir d'une suspension réalisée avec une noix de selle dans 3 ml d'eau physiologique stérile.

La lecture se fait après 24 heures d'incubation en aérobiose dans une étuve à 37°C.

La gélose BCP (pourpre de bromocrésol) est un milieu non sélectif et non enrichi indiquant, grâce à un indicateur de pH (pourpre de bromocrésol), si la bactérie fermente le lactose du milieu (lactose +) ou non (lactose -). Les bactéries utilisant le lactose comme source d'énergie produisent de l'acide, ce qui entraîne une acidification du milieu, donc le virage de l'indicateur de pH. Les bactéries sont alors « lactose + ».

A l'inverse, si les bactéries n'utilisent pas le lactose du milieu, il n'y a pas d'acidification du milieu, donc il reste pourpre. Elles sont donc « lactose - ». Ce critère est important dans l'identification de certaines bactéries comme le genre *Shigella* ou *Salmonella*.

La gélose Hecktoen est un milieu de culture servant à isoler les genres *Shigella*, *Salmonella* et *Yersinia*. Elle inhibe la croissance des bactéries Gram + et des entérobactéries commensales ou saprophytes. Ceci est dû à la forte concentration du milieu en sels biliaires et en vert brillant. La lecture après incubation consiste à repérer les colonies suspectes de couleur bleues-vertes (dus à l'indicateur de pH) qui n'ont pas utilisées les trois glucides du milieu, à savoir le lactose, le glucose et la salicine et donc n'ont pas acidifié le milieu, avec ou sans centre noir (production de sulfure de fer noir due à la réduction du thiosulfate en sulfure d'hydrogène). D'autre part, les colonies couleur saumon avec ou sans centre noir (H₂S +/-) sont non suspectes puisqu'il peut s'agir de bactéries commensales de la flore intestinale comme *Escherichia coli*, ou les genres *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, etc.

La gélose Chapman contient une forte concentration en NaCl, d'où l'isolement des bactéries halophiles telles que *Staphylococcus*, et du mannitol qui induit la forte suspicion de *Staphylococcus aureus*. En effet, en fermentant ce sucre, il y a acidification du milieu et donc changement de couleur (du rouge au jaune), de par l'indicateur coloré de pH (rouge de phénol). Les colonies jaunes doivent donc être confirmées comme *Staphylococcus aureus*.

Enfin un bouillon sélénite est ensemencé directement avec une noix de selle. Il est utilisé pour l'enrichissement sélectif des *Salmonelles*. En effet, la teneur en sélénite (ion) provoque l'inhibition des microorganismes autres que les *Salmonelles*, sauf les *Pseudomonas* et *Proteus*. Après 24 heures d'incubation à 37°C, ce bouillon est repiqué sur une gélose Hecktoen, c'est-à-dire qu'une goutte de ce bouillon est ensemencée sur cette gélose. Sa lecture se fait 24 heures après incubation à 37°C (Sacheau Guenaël, 2013).

III-4-2- Identification

III-4-2-1-Examen macroscopique

Une observation macroscopique permet de décrire l'aspect des colonies, obtenues sur milieu solide (taille, pigmentation, contour, aspect, viscosité) (Yan et Polk, 2004).

III-4-2-2- Examen microscopique

L'observation microscopique au grossissement (G x100) permet de classer les bactéries selon leur Gram, leur morphologie cellulaire, leur mode d'association (**Joffin et Leyral. 1996**).

III-4-2-2-1- Examen à l'état frais

L'examen à l'état frais permet d'observer les bactéries vivantes et de mettre en évidence leur :

- Mobilité.
- Mode de groupement.
- Faire une approche de leur morphologie.

Une méthode rapide consiste à observer entre lame et lamelle une suspension bactérienne à l'objectif 40.

III-4-2-2-2- Coloration de Gram

Nécessaire à l'observation microscopique car elle nous oriente suite aux formes observées vers les démarches à suivre pour les autres tests. Cette étape sert à colorer les bactéries Gram- en rose et les Gram+ en violet.

III-4-2-3-Etude de type respiratoire

III-4-2-3-1- Test de catalase

Cette enzyme est utilisée en bactériologie systématique pour l'identification des bactéries. Il s'agit de mettre en contact une colonie de la bactérie à étudier en présence d'eau oxygénée (à 10 volumes). Une effervescence (dû à un dégagement de dioxygène) signe la présence d'une catalase.

III-4-2-3-2- Teste d'oxydase

Les bactéries possédant une chaîne respiratoire complète sont dotées d'une cytochrome oxydase. La mise en évidence de cette oxydase est effectuée à l'aide d'un disque imprégné d'une solution aqueuse à 1% de chlorhydrate de diméthylparaphénylène diamine qui forme un complexe violet au contact de cette enzyme. Les colonies sont déposées à l'aide d'une pipette pasteur (**Francois et al. 2007**).

III-4-2-4- Tests biochimiques

A partir d'une culture de 24 heures sur gélose nutritive, on prend avec une anse de platine calibrée une seule colonie bien isolée, et on doit l'ensemencer sur milieu TSI (gélose incliné du Triple Sugar Iron), ce milieu estensemencé avec les bactéries étudiées en effectuant des stries à la surface de la pente de la gélose puis le culot estensemencé par piqûre centrale. Après 24 heures d'incubation à 37°C. Si les bactéries acidifient le glucose en anaérobiose relative (culot), le culot vire au jaune. Si le germe n'utilise pas le lactose, la pente devient rouge. Le milieu peut

être coloré en noire par production de H₂S. La présence de gaz est détectée la mise en évidence de bulles ou par soulèvement de la gélose.

Des colonies suspectes sont alors reprises et mises en suspension dans 5 ml d'eau physiologique stérile. Cette suspension sert à ensemencer une galerie API 20E (**Rakoff-Nahoumet *al.* 2004**).

Les caractères révélés par ce type de galerie sont : fermentation du glucose, réduction des nitrates, recherche d'une β galactosidase (ONPG), recherche d'une uréase, d'une phénylalanine désaminase, utilisation du citrate, hydrolyse de l'esculine, formation d'indole, présence d'H₂S, réaction au rouge de méthyle (RM), réaction de Voges-Proskauer (VP), utilisation du malonate. Cette galerie, ensemencée, est incubée pendant 24 heures à 37°C puis révélée à l'aide des réactifs spécifiques fournis avec les galeries (**Holt *et al.* 1994**).

Enfin, à partir de la suspension précédente, une gélose nutritive est ensemencée puis incubée pour permettre d'avoir un nombre suffisant de colonies afin d'effectuer l'antibiogramme et la conservation des bactéries (**Megraud. 1996**).

III-4-2-5- Tests de coagulase

La coagulase une enzyme capable de coaguler le plasma sanguin. De nombreux auteurs ont essayé de relier la production de coagulase chez *Staphylococcus aureus* à sa capacité à produire une enterotoxine et par conséquent à son pouvoir pathogène.

Dans un tube à hémolyse introduire :

- Un volume de Plasma sanguin recueilli sur un tube EDTA.
- Un volume d'une culture de 24 heures pratiquée dans un bouillon BHIB à partir de Staphylocoque à tester.
- Bien homogénéiser.
- Incuber le tube 24 heures à 37°C.

III-5- Antibiogramme

Il est réalisé selon la méthode de diffusion en milieu gélosé Muller-Hinton et permet la détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques.

A partir d'une culture jeune de 18 à 24 heures, préparer une suspension bactérienne de 10⁸ UFC / ml équivalent de 0.5 Mcfarland exprimer par une densité optique de 0.08-0.1, à déterminer par la mesure de la transmittance à une longueur d'onde de 625 nm (spectrophotomètre) (**Opdyke *et al.* 2004**).

L'ensemencement des boîtes de pétri contenant le milieu de Muller Hinton par écouvillonnage ou par inondation puis laisser sécher 10 à 15 minutes à la température ambiante (**Dosso *et al.* 2000**).

Appliquer les disques d'antibiotiques (tableau n°1) à l'aide d'une pince en appuyant légèrement et incuber à 37°C pendant 24 heures.

La lecture des résultats s'effectue par la mesure des diamètres des zones d'inhibition autour des disques à l'aide d'un pied à coulisse (inclure le diamètre de disque) (**Tepe et al. 2004**).

Tableau 1 : Choix des antibiotiques vis-à-vis des bactéries étudiées

ATB	Abréviation	Charge de disque	Bactéries										
			E.coli G1	E.coli G2	Citrobacter brakii	Morganella morgani	E.hermanii	Enterobacter cloacae	Klebsiella oxycola	Pseudomonas aerogenosa	Proteus mirabilis	Staphylococcus aureus	
Ampiciline	AM	10	X	X	X	X	X	X	X	X		X	
Amoxiciline	AML	25	X	X	X	X	X	X	X	X		X	
Ticarcyline	TI	75	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Cefoxitine	FOX	30	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X
Cefotaxime	CTX	30	X	X	X	X	X	X	X	X		X	
Ceftazidime	CAZ	30	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Amikacine	AK	30	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Gentamicine	CN	15	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Tobramycine	TMN	10	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Kanamycine	K	30	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X
Chloranphenicol	C	30	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X
Tetracycline	TE	30	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X
Clindamycine	CD	2											X
Spiramycine	SP	100											X
Pristinamycine	RP	15											X
Erythromycine	E	15											X
Colistine	COL	10	X	X	X	X	X	X	X	X		X	
Trimethoprime	TMP	5	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X
Trimethoprime+sulfamides	SXT	25	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Ciprofloxacine	CIP	5	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Acide nalidixique	NA	30	X	X	X	X	X	X	X	X		X	
Ofloxacine	OFX	5	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X
Acide pipemidique	PI	20	X	X	X	X	X	X	X	X		X	
Rifampicine	RA	5											X
Acide fusidique	FA	10											X
Fofomycine	FF	50	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Vancomycine	VA	30											X

III-6- Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Artemisia herba alba* et *Pistacia lentiscus L* vis-à-vis les bactéries étudiées

III-6-1- Matériels végétale

Dans notre travail nous avons choisi la plante *Artemisia herba alba* qui a été récoltée entre le mois de mars et d'avril de la région d'Ain Dhab Wilaya de Tiaret (Figure n°8).



Figure n° 8 : *Artemisia herba alba*.

Concernant le *Pistacia lentiscus L*, la récolte a été réalisée dans le mois de février dans la région de Hassi Mameche Wilaya de Mostaganem. (Figure n°9)



Figure n° 9 : *Pistacia lentiscus L.*

III-6-2- Extraction des huiles essentielles de *Artemisia herba alba* et *Pistacia lentiscus L*

L'extraction des huiles essentielles des deux plantes a été effectuée par hydro-distillation dans un appareil de type Clevenger. Pour *Artemisia herba alba* trois distillations ont été réalisées par ébullition, pendant 1 heure et 30 minutes, de 200g de matériel végétal sec (séché pendant 48 h à l'étuve à 60 °C) avec 1 l d'eau distillée dans un ballon de 2 l surmonté d'une colonne de 60 cm de longueur reliée à un réfrigérant (Clevenger. 1928).

Pour le cas de *Pistacia lentiscus L*, la même expérimentation a été reproduite avec 200 grammes de feuilles et rameaux frais accompagnés de 1000ml d'eau distillée et chauffés pendant 6 heures (Figure n° 10).

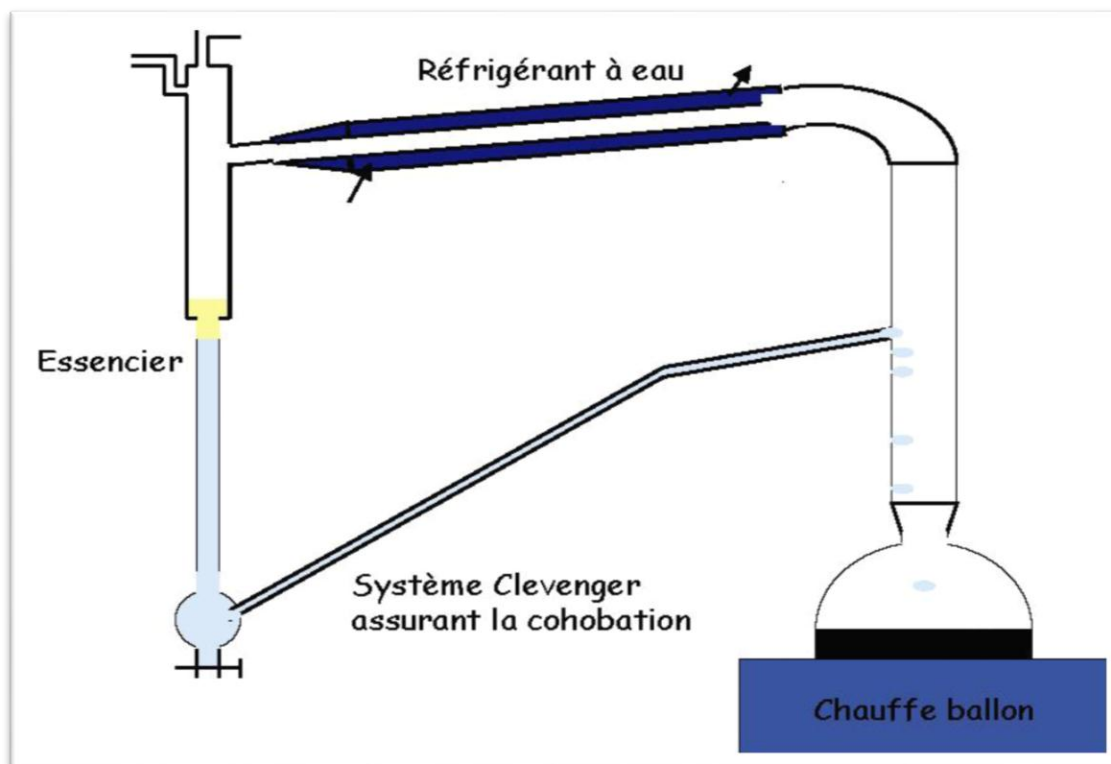


Figure n° 10 : Schéma du montage d'hydro-distillation (Clevenger). (Mengal et Mopon. 1994)

III-6-3- Calcul du rendement

Le rendement en huiles essentielles est le rapport de la quantité d'huile recueillie après hydro-distillation sur la quantité de la plante à traiter, exprimé en pourcentage (Caree., 1953).

Le rendement est calculé par la formule suivante :

$$R = PB / PA \times 100$$

R : rendement de l'huile essentielle en %

PB : quantité de l'huile essentielle en g

PA : quantité de la plante en g

III-7- Mis en évidence de l'effet des huiles essentielles de *Artemisia herba alba* et *Pistacia lentiscus L* sur les bactéries étudiées

Pour connaître l'effet inhibiteur des huiles essentielles, on applique soit la méthode de disque qui est une technique de diffusion sur milieu gélosé, soit la méthode de dilution en milieu liquide, ces deux méthodes consistent à mettre dans des milieux de cultures spécifique des germes en contact avec des huiles essentielles (aromatogramme) dans le but de connaître leur effet antimicrobien (Tepe et al. 2004).

III-7-1- Mode opératoire

A partir d'une culture jeune de 24 heures à 37° C sur gélose nutritive, une suspension bactérienne dense dans un tube d'eau physiologique et dont la turbidité est ajustée au spectromètre indiquant le chiffre 0.08 à 0,1, un volume de 100 µl de la suspension bactérienne est étalée par écouvillonnage sur des boîtes de pétri contenant le milieu gélosé de Mueller Hinton.

On dépose à la surface de chaque boîte des disques stérile en papier Wattman 4 de 6 mm de diamètre, puis à l'aide d'une micropipette on ajoute 5 µl de l'huile essentielle étudiée (**Duru et al. 2003**).

III-7-2-Lecture

La lecture des résultats se fait à l'aide d'un pied à coulisse, en mesurant la zone d'inhibition qui est représentée par une auréole formée autour de disque où aucune croissance n'est observée (**El hanbali et al. 2005**).

III-8- Détermination de la CMI et la CMB des huiles essentielles de *Artemisia herba alba* et *Pistacia lentiscus L* sur les bactéries étudiées

La méthode de référence pour mesurer l'activité d'un agent antimicrobien, vis-à-vis d'une bactérie donnée, consiste à déterminer dans des conditions bien standardisées, la concentration minimale d'un antimicrobien capable d'inhiber la croissance bactérienne. Pour le faire on réalise une gamme de dilution pour ce dernier, soit en milieu liquide, soit en milieu solide (**Dosso et al. 2000**).

III-8-1- Préparation des dilutions des huiles essentielles

Du fait de la non-miscibilité des huiles essentielles à l'eau et donc au milieu de culture, une mise en émulsion à raison de 10% grâce à Diméthyle sulfooxide (DMSO) (**Remmal et al. 1993. Satrani et al. 2001**). Elle permet d'obtenir dans le milieu une répartition homogène des huiles essentielles et d'augmenter au maximum le contact germe/composé. Des dilutions sont préparées au 1/10^e, 1/25^e, 1/50^e, 1/100^e, 1/200^e, 1/300^e, 1/400^e, 1/500^e, 1/600^e, 1/700^e, 1/800^e, 1/900^e et 1/1000^e dans cette solution de DMSO (Figure n° 11).

III-8-2- Préparation de l'inoculum

Des tubes à hémolyse contenant chacun 1,8 ml du milieu LB sont ensemencés par la bactérie à partir d'une culture jeune de 18 heures, dont la turbidité est ajustée à 0,08-0,1 par spectrophotomètre à une longueur d'onde 625nm. (Figure n° 11).

III-8-3- Détermination de la CMI en milieu liquide

Pour obtenir les concentrations finales de 1/100, 1/250, 1/500, 1/1 000, 1/2 000, 1/3 000, 1/4 000, 1/5 000, 1/6 000, 1/7 000, 1/8 000, 1/9 000, et 1/10000 (v/v), on ajoute 200µl de chaque dilution des huiles essentielles au tube d'hémolyse contenant l'inoculum.

Un tube à hémolyse contient 1,8ml d'inoculum et 200µl de DMSO sert comme témoin.

Les tubes sont incubés à 37 °C pendant 24 heures. (Figure n° 11).

III-8-3-1- Lecture

La CMI sera donnée par la concentration de l'huile essentielle du premier tube qui ne montre pas une croissance (trouble) visible à l'œil nu (**Amhis et al. 2001**).

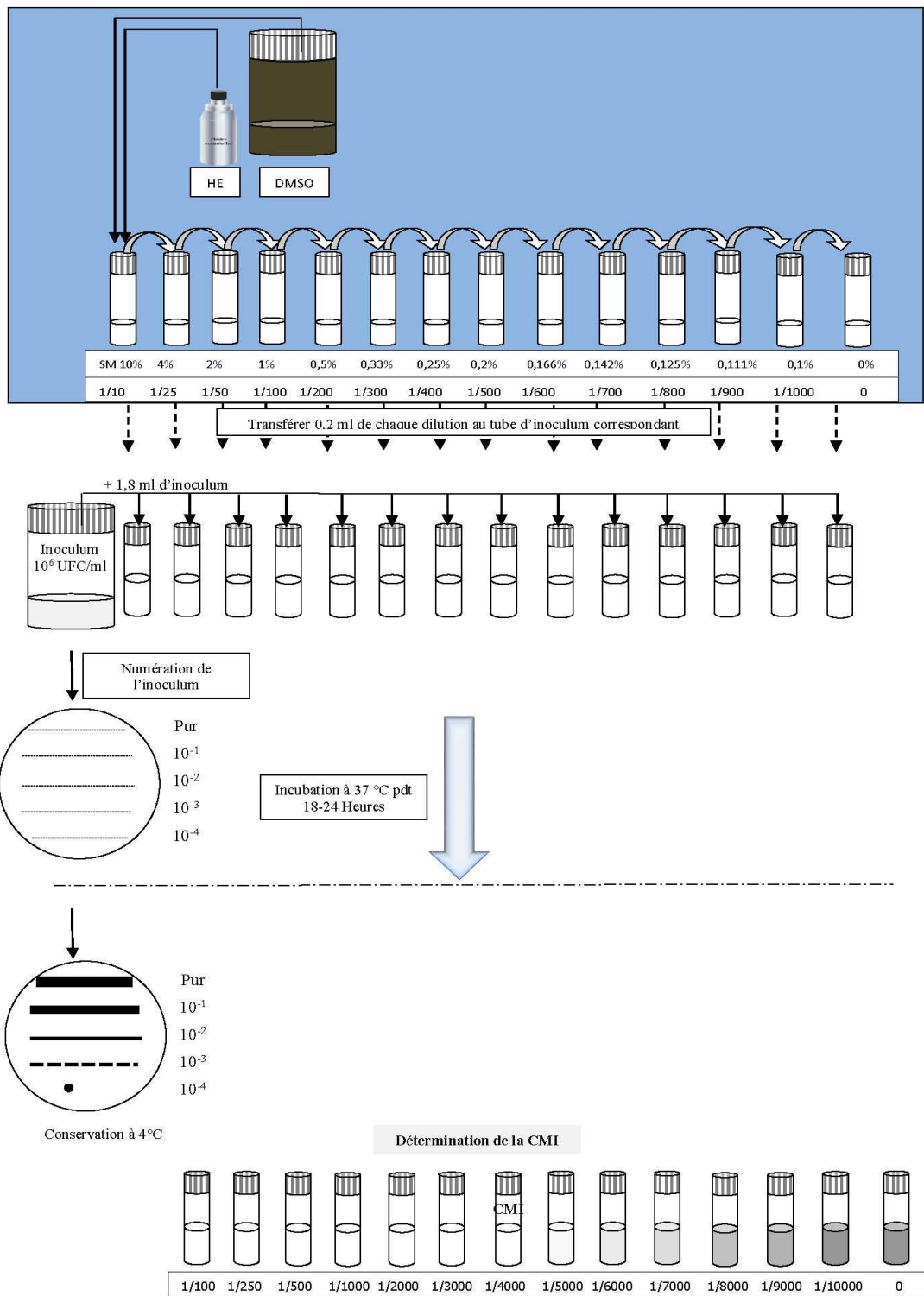


Figure n° 11: Schéma de la détermination de la CMI

III-8-4- Détermination de CMB

La gélose nutritive coulée dans des boîtes de pétri estensemencée en stries par 10ul des contenus des tubes ayant une concentration \geq CMI dans la série de dilution précédente. La CMB est déterminée après une incubation de 24 heures à 37°C.

La concentration minimale bactéricide (CMB), est la concentration de l'agent antimicrobien qui laisse au plus 0.01% de germes survivants. Pour sa détermination, le tube témoin a été dilué jusqu'à 10^{-4} . Cette dilution a représenté 0,01% de survie. Elle est repiquée par stries de 5 cm sur une gélose nutritive puis incubée à 37°C pendant 24 heures. Le nombre de germes obtenus sur la strie de la dilution 10^{-4} est comparé à celui de chaque tube expérimental également repiqué par strie de 5cm. Ainsi, le premier tube expérimental dont le nombre de germes présent au niveau de la strie est inférieur ou égal à celui de la dilution 10^{-4} correspondra à la CMB. La figure n° 12 représentent d'une part le repiquage sur gélose du tube témoin de croissance et ses dilutions au 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} et 10^{-4} et d'autre part, les repiquages de certains tubes expérimentaux par stries sur gélose.

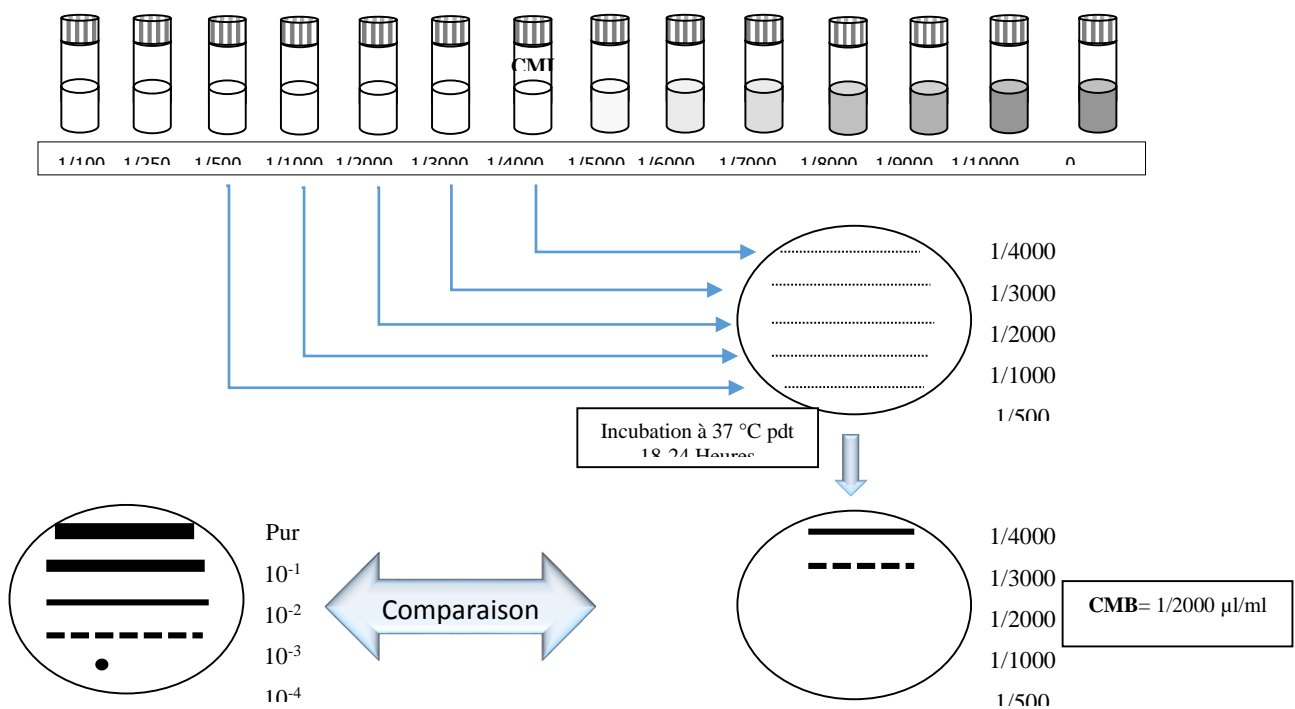


Figure n° 12: Schéma de la détermination de la CM

Chapitre IV : Résultats et discussion

IV-1- Isolement et identification des bactéries

IV-1-1- Examen macroscopique

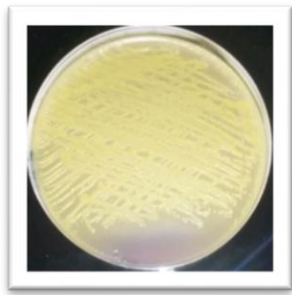
La culture a été effectuée après 24 heures d'incubation en anaérobiose à 37°C .

Les colonies obtenues sur gélose BCP, étant de 2 à 3 mm de diamètre, blanche (*Citrobacter brakii*), opaque, arrondies, lisses à bords réguliers, pigment jaune (*E.coli*, *E.hermanii*). Ces mêmes caractéristiques ont été constatées chez *Citrobacter brakii* (Catherine. 2006), *E.coli* (Maryse et Danielle. 2006), *Morganella morganii*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxycota* (Danielle. 2006), *E.hermanii* (Maryse et Danielle. 2004)

Les colonies obtenues sur gélose Hecktoen sont : grosses et transparentes (*Proteus mirabilis*), plates, un pigment vert brillant et une odeur aromatique (*pseudomonas aeruginosa*). Ces caractéristiques ont été observées par (Danielle. 2006) chez ces deux bactéries.

Et enfin les colonies obtenues sur gélose Chapman ont les caractères suivants : lisses, rondes, bombées et pigmentées en jaune orangé. C'est ce qui est observés chez *Staphylococcus aureus* (Danielle. 2013)

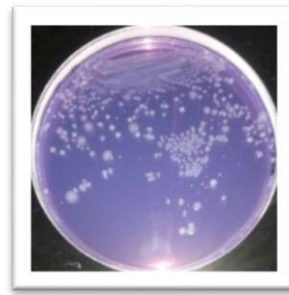
La figure n°13 regroupe l'aspect macroscopique de toutes les bactéries isolées.



E.coli G1



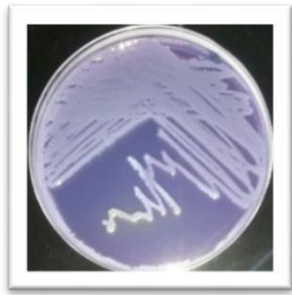
E.coli G2



E.hermanii



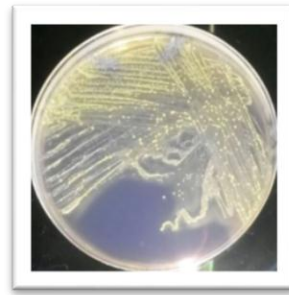
Morganella morganii



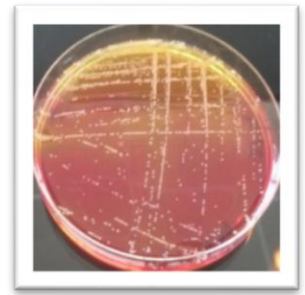
Citrobacter brakii



Enterobacter cloacae



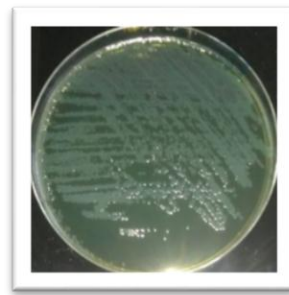
Klebsiella oxycota



Staphylococcus aureus



Pseudomonas aeruginosa



Proteus mirabilis

Figure n° 13: Examen macroscopique des bactéries étudiées

IV-1-2- Examen microscopique

IV-1-2-1- A l'état frais

Les bactéries examinées à l'état frais apparaissent mobiles sauf *Staphylococcus aureus* et *Klebsiella oxycota* sont immobiles (tableau n°2). Les entérobactéries se présentent sous forme de bacilles immobiles ou mobiles péritriches.

La ciliature polaire de type monotriche est caractéristique de *Pseudomonas aeruginosa* (Terrier et al. 1990).

Bactéries	Mobilité	Type de mouvement
<i>E.coli G1</i>	+	Péritriche
<i>E.coli G2</i>	+	Péritriche
<i>Citrobacter brakii</i>	+	Péritriche
<i>Morganella morgani</i>	+	Péritriche
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	/
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	Monotriche
<i>Klebsiella oxycota</i>	-	/
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	Péritriche
<i>Proteus mirabilis</i>	+	Péritriche
<i>Escherichia hermanii</i>	+	Péritriche

+ : mobile.

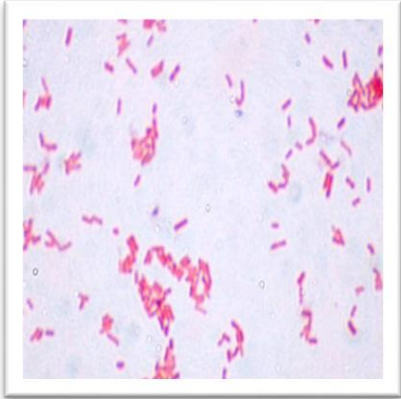
- : immobile.

IV-1-2-2- Coloration de Gram

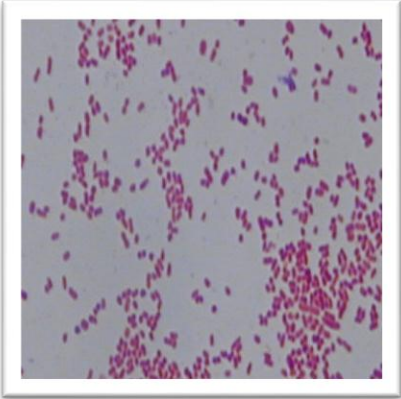
La coloration de Gram, réalisée à partir des colonies distinctes, montre la présence des bacilles et diplobacilles à Gram négatif et des cocci à Gram positif tableau n°3 et figure n°14.

Tableau 3: Coloration de Gram des bactéries étudiées

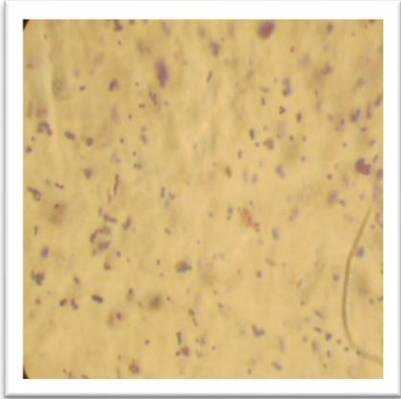
Bactéries	Coloration	Gram
<i>E.coli G01</i>	Rose	Négatif
<i>E.coli G02</i>	Rose	Négatif
<i>Citrobacter brakii</i>	Rose	Négatif
<i>Morganella morganii</i>	Rose	Négatif
<i>Staphylococcus aureus</i>	Violet	Positif
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Rose	Négatif
<i>Klebsiella oxycota</i>	Rose	Négatif
<i>Enterobacter cloacae</i>	Rose	Négatif
<i>Proteus mirabilis</i>	Rose	Négatif
<i>Escherichia hermanii</i>	Rose	Négatif



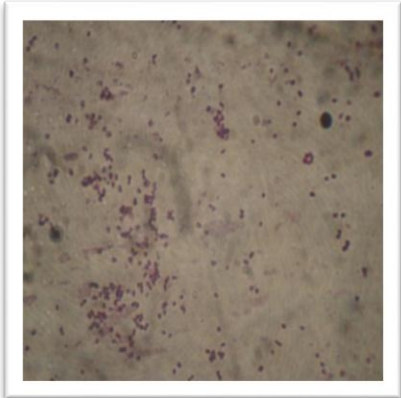
E.coli



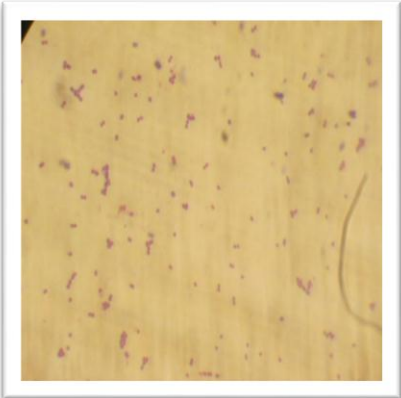
Citrobacter brakii



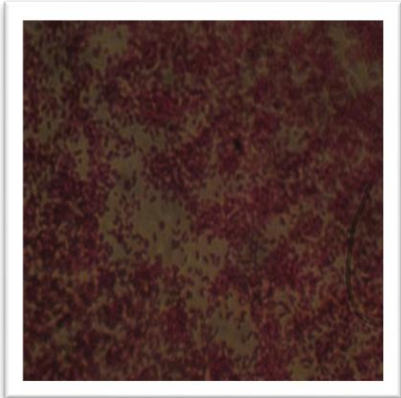
Morganella morganii



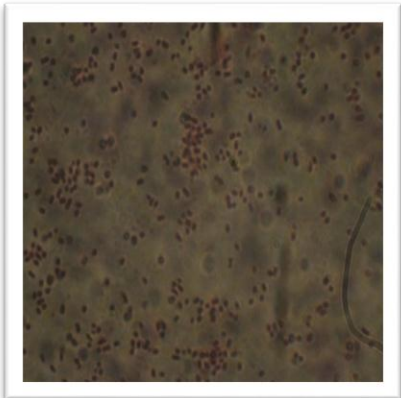
Staphylococcus aureus



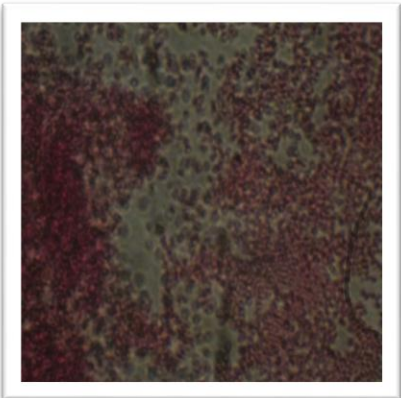
Pseudomonas aeruginosa



Citrobacter brakii



Enterobacter cloacae



Proteus mirabilis

Figure n° 14: Coloration de Gram des bactéries étudiées 100

IV-1-3- Etude du type respiratoire

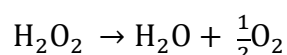
Les observations morphologiques réalisées, sont complétées par la recherche des caractères biochimiques ; oxydase qui est négative pour les bactéries étudiées sauf pour les *Pseudomonas aeruginosa* il est positif. La catalase ; ce test est positif pour toutes les bactéries étudiées Les résultats sont indiqués dans le tableau n°4 et figure n°15.

Tableau 4: Résultats des tests de type respiratoire des bactéries étudiées		
Bactéries	Oxydase	Catalase
<i>E.coli G01</i>	-	+
<i>E.coli G02</i>	-	+
<i>Citrobacter brakii</i>	-	+
<i>Morganella morgani</i>	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+
<i>Klebsiella oxycota</i>	-	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	+
<i>Proteus mirabilis</i>	-	+
<i>Escherichia hermanii</i>	-	+

+ : positive.

- : négative.

En présence d'oxygène moléculaire, certaines réactions métaboliques conduisent à la formation d'eau oxygénée. La présence d'une catalase active est traduite, par un dégagement gazeux abondant sous la forme de mousse ou de bulles d'oxygène, 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 cytochrome-oxydase qui oxyde le cytochrome c réduit. Ce test met en évidence la présence de cytochrome c dans les chaînes respiratoires grâce à des réactifs ayant le même potentiel d'oxydo-réduction que le cytochrome c. La présence d'une cytochrome-oxydase se traduit, en 20 à 60 secondes, par l'apparition d'une coloration rouge virant rapidement au violet très foncé (**Megraud. 1996**).

La réaction est schématiquement la suivante :
 cytochrome oxydase + réactif réduit → réactif coloré.

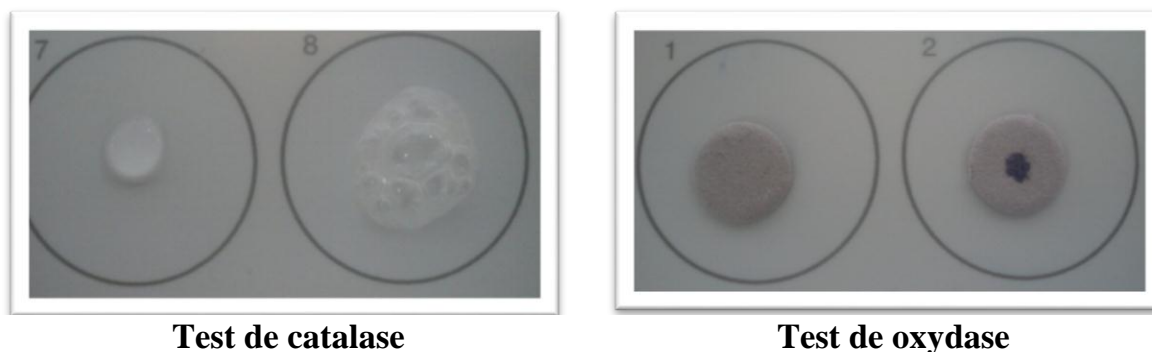


Figure n° 15: Résultats des tests du type respiratoire des bactéries étudiées

IV-1-4- Tests biochimiques

Sur milieu TSI, L'utilisation de l'un des sucres contenus dans le milieu se traduit par une acidification (virage au jaune du rouge de phénol). Une alcalinisation se révèle par une coloration rouge-foncée. La production de sulfure d'hydrogène à partir du thiosulfate est mise en évidence par la formation d'une coloration noire, le tableau n°5 regroupe les résultats du TSI.

Tableau 5: Résultats du TSI des bactéries étudiées

Bactéries	TSI				
	Glucose	Saccharose	Lactose	H2S	Gaz
<i>E.coli G1</i>	+	-	-	-	+
<i>E.coli G2</i>	+	-	-	-	+
<i>Citrobacter brakii</i>	+	+	+	-	+
<i>Morganella morganii</i>	+	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	/	/	/	/	/
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	+	-
<i>Klebsiella oxycota</i>	+	+	+	-	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	+	+	-	+
<i>Proteus mirabilis</i>	+	-	-	+	+
<i>Escherichia hermanii</i>	+	+	+	-	+

+ : Positive.

- : Négative

Le tableau de lecture des galeries API 20 E (Annexe) comporte 20 tests (**Hurst et al., 2001**). Les résultats (Tableau n° 6) des réactions produites au cours de la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs (Figure n°16)



E. coli G2



Pseudomonas aeruginosa



Proteus mirabilis

Figure n° 16 : Résultats des API 20 E des bactéries étudiées

Tableau 6: Lecture des résultats d'une galerie biochimique API 20

Tests	<i>E.coli</i> G1	<i>E.coli</i> G2	<i>Citrobacter</i> <i>brakii</i>	<i>Morganella</i> <i>morganii</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	<i>Klebsiella</i> <i>oxycota</i>	<i>Enterobacter</i> <i>cloacae</i>	<i>Proteus</i> <i>mirabilis</i>	<i>Escherichia</i> <i>hermanii</i>
ONPG	+	+	+	+	-	+	+	+	+
ADH	+	+	+	+	+	-	+	-	-
LDC	-	+	-	+	-	+	-	+	-
ODC	+	+	+	+	-	-	+	+	+
CIT	+	-	+	+	+	+	+	+	+
H2S	-	+	+	-	-	-	-	+	-
URE	+	-	-	+	+	-	-	+	-
TDA	+	-	-	+	-	-	-	+	-
IND	-	+	+	+	-	+	-	-	+
VP	-	-	-	-	-	+	+	+	-
GEL	-	-	-	-	+	-	-	-	-
GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MAN	+	+	+	-	-	+	+	+	+
INO	+	-	-	+	-	+	-	-	-
SOR	+	+	+	-	-	+	+	-	-
RHA	+	+	+	-	-	+	-	-	+
SAC	-	+	+	+	+	+	+	+	+
MEL	-	+	+	-	+	+	+	+	-
AMY	+	-	+	-	-	+	+	+	+
ARA	+	+	+	+	+	+	+	-	+

L'interprétation des résultats trouvés dans le tableau ci-dessus est basée sur le tableau d'identification des entérobactéries (Annexe).

IV-1-5- Test de coagulase

Après incubation de 24 heures à 37° C nous avons obtenus une coagulase positive (Figure n°17). La réaction est considérée comme positive lorsque le coagulum occupe les $\frac{3}{4}$ 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 apparait en moins de 24 heures (WWW.biokar-diagnostics.fr).

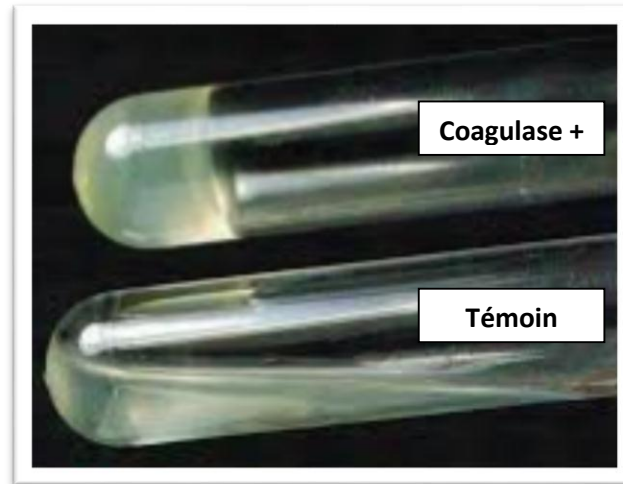


Figure n° 17: Résultat du test de la coagulase chez les staphylococcus aureus

IV-2- Antibiogramme

La turbidité de l'inoculum est obtenue par le spectrophotomètre dont l'absorbance varie de 0,08 à 0,1.

Le choix des antibiotiques utilisés pour l'étude de la sensibilité a été faite selon la recommandation de l'OMS 2002 (standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle national), dont la technique pratiquée est celle de la méthode des disques.

L'observation des boîtes pétri après incubation à 37°C pendant 24 heures nous a donné les résultats indiqués dans le tableau n° 7 et figure n°18.

Tableau 7: Sensibilité des bactéries étudiées aux antibiotiques testés

ATB	abréviation	Charge de disques	Diamètre			<i>E.coli G1</i>		<i>E.coli G2</i>		<i>Citrobacter brakii</i>	
			R	I	S	ϕ	Résultat	ϕ	Résultat	ϕ	Résultat
Ampiciline	AM	10	≤14	/	≥ 14	R	R	R	R	R	R
Amoxiciline	AML	25	≤16	17-20	≥21	R	R	R	R	R	R
Ticarcyline	TI	75	≤23	/	≥23	R	R			R	R
Cefoxitine	Fox	30	≤15	16-18	≥19	27,97	S	23,8	S	R	R
Cefotaxime	CTX	30	≤23	24-25	≥26	29,24	S	27,7	S	R	R
Ceftazidime	CAZ	30	≤19	20-21	≥22	21,25	I			R	R
Amikacine	AK	30	≤13	14-15	≥16	22,33	S	19,3	S	22,42	S
Gentamicine	CN	15	≤16	17	≥18	21,36	S	22,14	S	20,14	S
Tobramycine	TMN	10	≤14	15-16	≥17	21,44	S			23,3	S
Kanamycine	K	30	≤15	16	≥17	19,27	S	17,65	S	19,03	S
Chloramphenicol	C	30	≤17	/	≥17	28,68	S	30,75	S	27,66	S
Tetracycline	TE	30	≤17	18	≥19	8,75	R	13,4	R	21,49	S
Clindamycine	CD	2	≤19	20-21	≥22	/	/	/	/	/	/
Spiramycine	SP	100	≤19	20-23	≥24	/	/	/	/	/	/
Pristinamycine	RP	15	≤19	20-21	≥22	/	/	/	/	/	/
Erythromycine	E	15	≤18	19-20	≥21	/	/	/	/	/	/
Colistine	COL	10	≤15	/	≥15	8,9	R	10	R	9,46	R
Trimethoprime	TMP	5	≤15	16-17	≥18	R	R	R	R	23,7	S
Trimethoprime+ sulfamide	SXT	25	≤13	14-15	≥16	R	R	R	R	27,78	S
Ciprofloxacine	CIP	5	≤19	20-21	≥22	R	R	12,2	I	27,2	S
Acide nalidixique	NA	30	≤14	15-18	≥19	R	R	R	R	21,17	S
Ofloxacine	OFX	5	≤19	20-21	≥22	7,27	R	10,98	R	24,78	S
Acide pipemidique	PI	20	≤14	15-18	≥19	R	R	12,68	R	29,82	S
Rifampicine	RA	5	≤23	24-25	≥26	/	/	/	/	/	/
Acide Fusidique	FA	10	≤24	/	≥24	/	/	/	/	/	/
Vancomycine	VA	30	RN	/	≥17	/	/	/	/	/	/
Fosfomycine	FF	50	≤14	/	≥14	23,19	S	26,55	S	15,62	S

Tableau 7 : Sensibilité des bactéries étudiées aux antibiotiques testés (suite)

ATB	abréviation	Charge de disques	Diamètre			<i>Morganella morganii</i>		<i>Klebsiella oxycota</i>		<i>Enterobacter cloacae</i>	
			R	I	S	Φ	Résultat	Φ	Résultat	Φ	Résultat
Ampiciline	AM	10	≤14	/	≥ 14	10,39	R	R	R	R	R
Amoxiciline	AML	25	≤16	17-20	≥21	7,38	R	R	R	R	R
Ticarcyline	TI	75	≤23	/	≥23	28,72	S	11,92	R	23,38	S
Cefoxitine	Fox	30	≤15	16-18	≥19	17,87	I	24,35	S	16,51	I
Cefotaxime	CTX	30	≤23	24-25	≥26	28,44	S	30,81	S	27,91	R
Ceftazidime	CAZ	30	≤19	20-21	≥22			13,72	R	20,09	I
Amikacine	AK	30	≤13	14-15	≥16	25,25	S	23,57	S	20,65	S
Gentamicine	CN	15	≤16	17	≥18	18,9	S	19,35	S	18,88	S
Tobramycine	TMN	10	≤14	15-16	≥17	22,9	S	21,2	S	17,53	S
Kanamycine	K	30	≤15	16	≥17	14,97	R	14,64	R	16,68	I
Chloramphenicol	C	30	≤17	/	≥17	27,29	S	30,75	S	30,02	S
Tetracycline	TE	30	≤17	18	≥19	25,58	S	21,3	S		
Clindamycine	CD	2	≤19	20-21	≥22	/	/	/	/	/	/
Spiramycine	SP	100	≤19	20-23	≥24	/	/	/	/	/	/
Pristinamycine	RP	15	≤19	20-21	≥22	/	/	/	/	/	/
Erythromycine	E	15	≤18	19-20	≥21	/	/	/	/	/	/
Colistine	COL	10	≤15	/	≥15	R	R	11,29	R	10,69	R
Trimethoprime	TMP	5	≤15	16-17	≥18	28,78	S	26,72	S	24,23	S
Trimethoprime+ sulfamide	SXT	25	≤13	14-15	≥16	26,17	S	28,6	S	27,97	S
Ciprofloxacine	CIP	5	≤19	20-21	≥22	35	S	31	S	34,37	S
Acide nalidixique	NA	30	≤14	15-18	≥19	27,47	S	22,73	S	21,2	S
Ofloxacine	OFX	5	≤19	20-21	≥22	33,03	S	25,53	S	31,45	S
Acide pipemidique	PI	20	≤14	15-18	≥19	29,23	S	25,07	S	25,71	S
Rifampicine	RA	5	≤23	24-25	≥26	/	/	/	/	/	/
Acide Fusidique	FA	10	≤24	/	≥24	/	/	/	/	/	/
Vancomycine	VA	30	RN	/	≥17	/	/	/	/	/	/
Fosfomycine	FF	50	≤14	/	≥14	R	R	16,87	S	14,44	S

Tableau 7: Sensibilité des bactéries étudiées aux antibiotiques testés (suite)

ATB	abréviation	Charge de disques	Diamètre			<i>Proteus mirabilis</i>		<i>Escherichia hermanii</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
			R	I	S	Φ	Résultat	Φ	Résultat	Φ	Résultat
Ampiciline	AM	10	≤14	/	≥ 14	17,89	S	13,26	R	/	/
Amoxiciline	AML	25	≤16	17-20	≥21	23,67	S	18,02	I	/	/
Ticarcyline	TI	75	≤23	/	≥23	29,45	S	24,44	S	18,9	S
Cefoxitine	Fox	30	≤15	16-18	≥19	27,12	S	26,17	S	/	/
Cefotaxime	CTX	30	≤23	24-25	≥26	38,03	S	27,68	S	/	/
Ceftazidime	CAZ	30	≤19	20-21	≥22	25,9	S	20,32	I	17,22	R
Amikacine	AK	30	≤13	14-15	≥16	23,84	S	22,65	S	22,9	S
Gentamicine	CN	15	≤16	17	≥18	23,41	S	22,98	S	19,78	S
Tobramycine	TMN	10	≤14	15-16	≥17	21,32	S	21,21	S	16,55	S
Kanamycine	K	30	≤15	16	≥17	20,58	S	20,59	S	/	/
Chloramphenicol	C	30	≤17	/	≥17	26,61	S	28,08	S	/	/
Tetracycline	TE	30	≤17	18	≥19	R	R			/	/
Clindamycine	CD	2	≤19	20-21	≥22	/	/	/	/	/	/
Spiramycine	SP	100	≤19	20-23	≥24	/	/	/	/	/	/
Pristinamycine	RP	15	≤19	20-21	≥22	/	/	/	/	/	/
Erythromycine	E	15	≤18	19-20	≥21	/	/	/	/	/	/
Colistine	COL	10	≤15	/	≥15	R	R	10,81	R	/	/
Trimethoprime	TMP	5	≤15	16-17	≥18	21,33	S	30,75	S	/	/
Trimethoprime+ sulfamide	SXT	25	≤13	14-15	≥16	25,19	S	27,22	S	9,21	R
Ciprofloxacine	CIP	5	≤19	20-21	≥22	27,26	S	36,36	S	31,29	S
Acide nalidixique	NA	30	≤14	15-18	≥19	23,19	S	26,62	S	/	/
Ofloxacine	OFX	5	≤19	20-21	≥22	36,44	S	35,22	S	/	/
Acide pipemidique	PI	20	≤14	15-18	≥19	27,38	S	27,47	S	/	/
Rifampicine	RA	5	≤23	24-25	≥26	/	/	/	/	/	/
Acide Fusidique	FA	10	≤24	/	≥24	/	/	/	/	/	/
Vancomycine	VA	30	RN	/	≥17	/	/	/	/	/	/
Fosfomycine	FF	50	≤14	/	≥14	27,73	S	21,59	S	R	R

Tableau 7 : Sensibilité des bactéries étudiées aux antibiotiques testés (suite)

ATB	abréviati on	Charge de disques	Diamètre			<i>Staphylococcus aureus</i>	
			R	I	S	Ø	Résultat
Ampiciline	AM	10	≤14	/	≥ 14	/	/
Amoxiciline	AML	25	≤16	17-20	≥21	/	/
Ticarcyline	TI	75	≤23	/	≥23	/	/
Cefoxitine	Fox	30	≤15	16-18	≥19	19,25	R
Cefotaxime	CTX	30	≤23	24-25	≥26	/	/
Ceftazidime	CAZ	30	≤19	20-21	≥22	/	/
Amikacine	AK	30	≤13	14-15	≥16	26,33	S
Gentamicine	CN	15	≤16	17	≥18	19,7	R
Tobramycine	TMN	10	≤14	15-16	≥17	21,64	S
Kanamycine	K	30	≤15	16	≥17	14,7	I
Chloramphenicol	C	30	≤17	/	≥17	21,58	S
Tetracycline	TE	30	≤17	18	≥19	32,88	S
Clindamycine	CD	2	≤19	20-21	≥22	17,62	R
Spiramycine	SP	100	≤19	20-23	≥24	22,58	I
Pristinamycine	RP	15	≤19	20-21	≥22	31,66	S
Erythromycine	E	15	≤18	19-20	≥21	22,29	S
Colistine	COL	10	≤15	/	≥15	/	/
Trimethoprime	TMP	5	≤15	16-17	≥18	17,06	S
Trimethoprime+sulfamide	SXT	25	≤13	14-15	≥16	28,83	S
Ciprofloxacine	CIP	5	≤19	20-21	≥22	26,24	S
Acide nalidixique	NA	30	≤14	15-18	≥19	/	/
Ofloxacin	OFX	5	≤19	20-21	≥22	22,66	S
Acide pipemidique	PI	20	≤14	15-18	≥19	/	/
Rifampicine	RA	5	≤23	24-25	≥26	28,44	S
Acide Fusidique	FA	10	≤24	/	≥24	9,36	R
Vancomycine	VA	30	RN	/	≥17	16,24	RN
Fosfomycine	FF	50	≤14	/	≥14	26,49	S

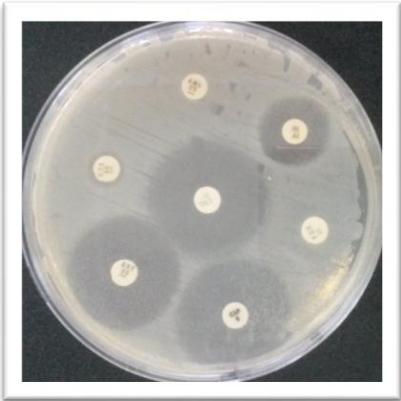
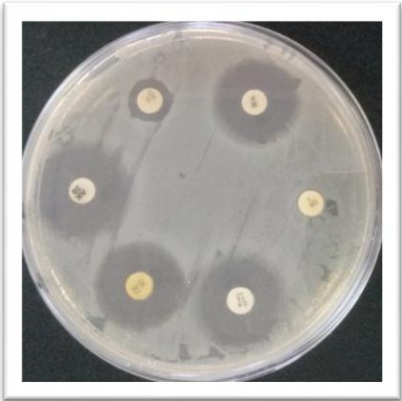
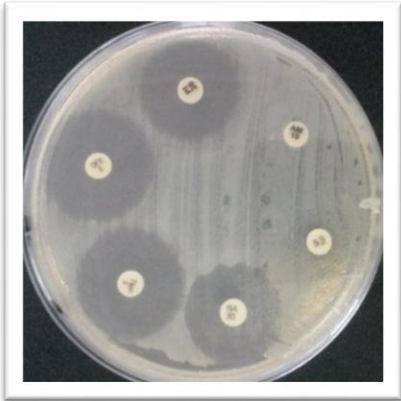
Les résultats indiqués dans le tableau n°7 et la figure n° 18 montrent que *E.coli*, *Citrobacter brakii*, *Morganella morganii* et *Staphylococcus aureus* sont des bactéries plus résistantes par rapport aux autres bactéries étudiées.

Pour le cas de *E.coli G1* la zone d'inhibition est de 8,75 mm pour la Tétracycline, 8,9 mm pour la Colistine et 7,27 mm pour l'Ofloxacine. On constate aussi, l'absence totale de la zone d'inhibition pour les antibiotiques suivants : l'Ampiciline, l'Amoxiciline, la Ticarcylone, la Triméthoprime, la Triméthoprime+sulfamide, la Ciprofloxacine, l'Acide nalidixique et l'Acide pipemidique.

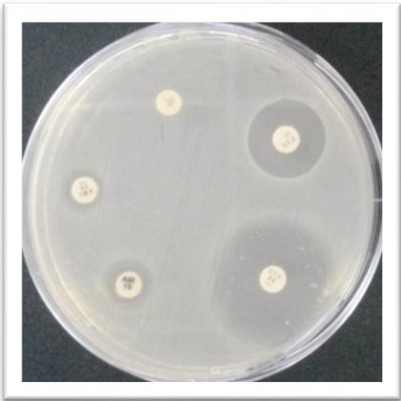
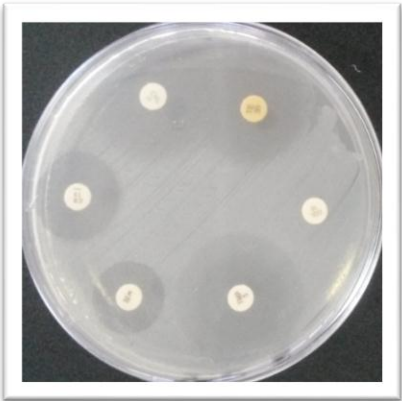
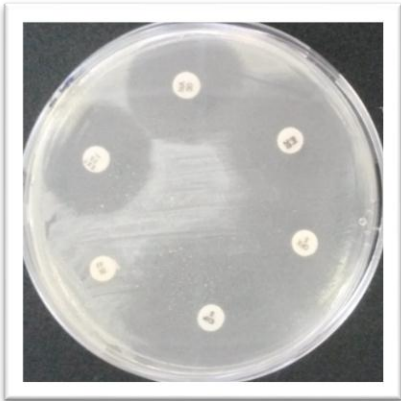
Concernant *Citrobacter brakii*, les résultats montrent que la zone d'inhibition est de 9,47 mm pour la Colistine et une absence de la zone d'inhibition pour ; l'Ampiciline, l'Amoxiciline, la Ticarcylone, la Cefoxitine, la Cefotaxime et la Ceftazidime.

Les résultats montrent dans le cas de *Morganella morganii*, que la zone d'inhibition est de 10,39 mm pour l'Ampiciline, 7,38 mm pour l'Amoxiciline, 14,96 mm pour la Kanamycine et une absence de la zone d'inhibition pour la Colistine et la Fosfomycine.

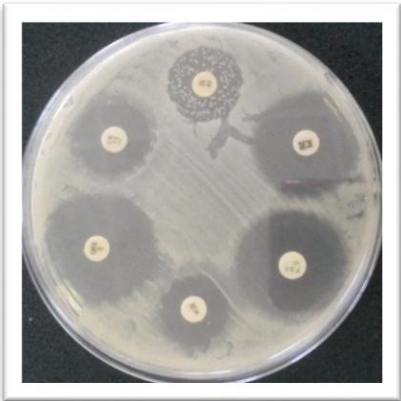
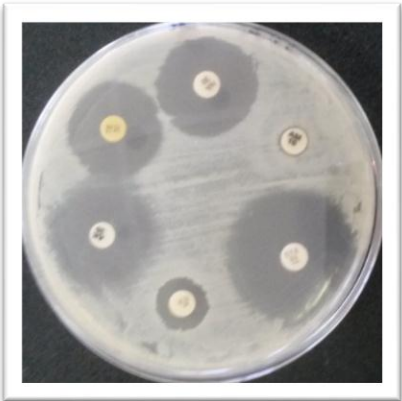
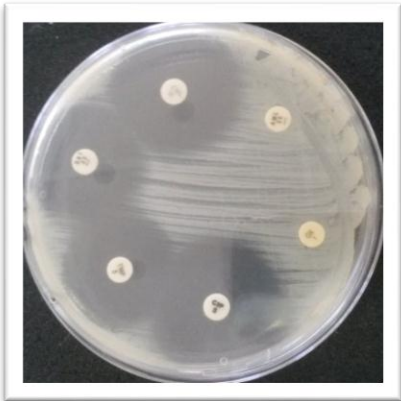
Enfin, pour le cas de *Staphylococcus aureus*, la zone d'inhibition est de 19,25 mm pour la Cefoxitine, 19,7 mm pour la Gentamycine, 17,62 mm pour la Clindamycine, 9,36 mm pour l'Acide fusidique et 16,24 mm pour la Vancomycine.



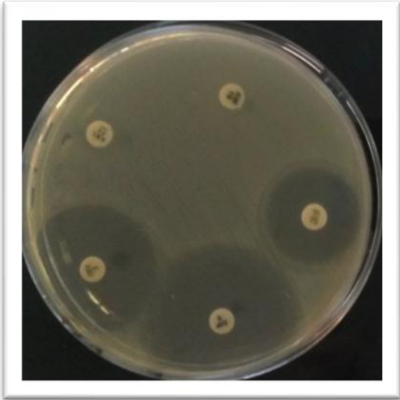
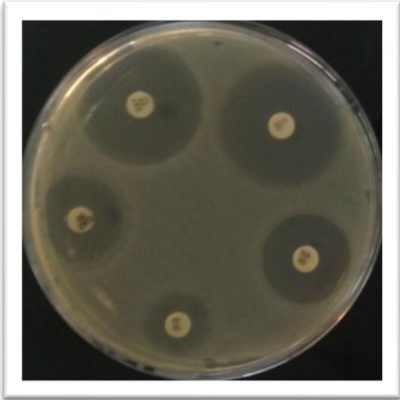
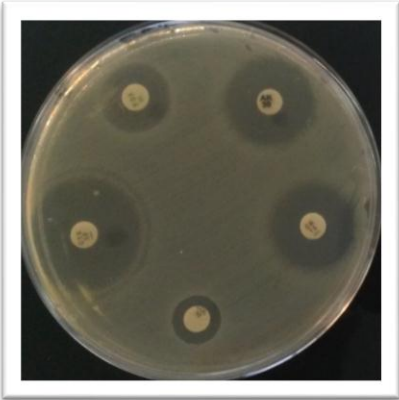
Citrobacter brakii



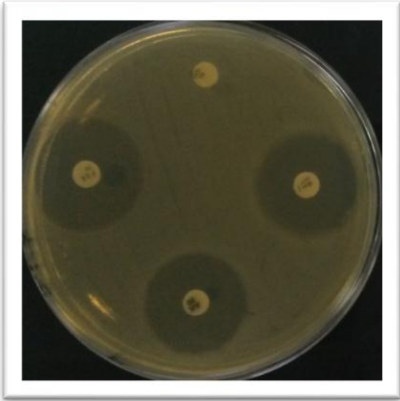
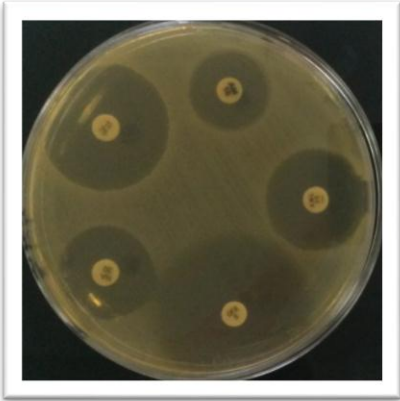
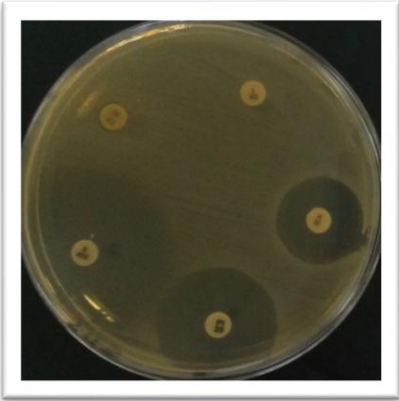
Morganella morganii



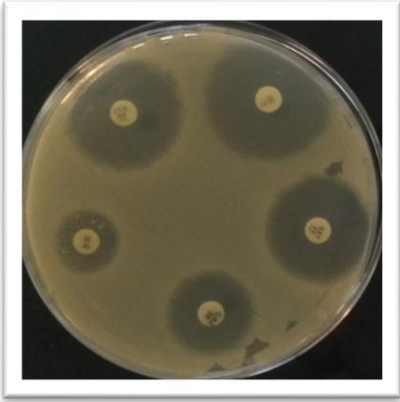
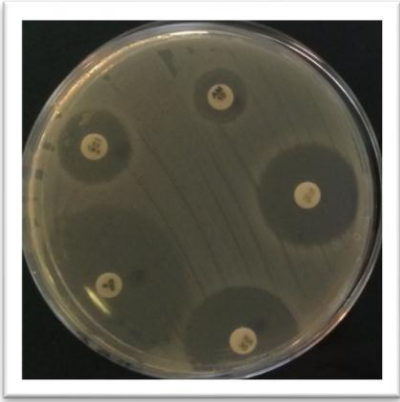
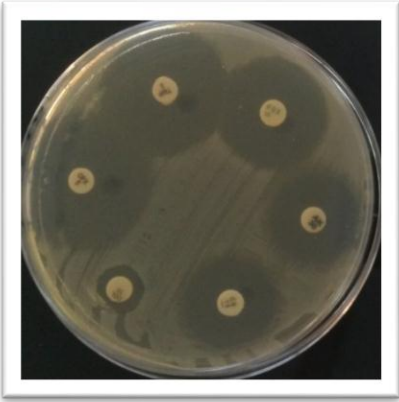
Klebsiella oxycota



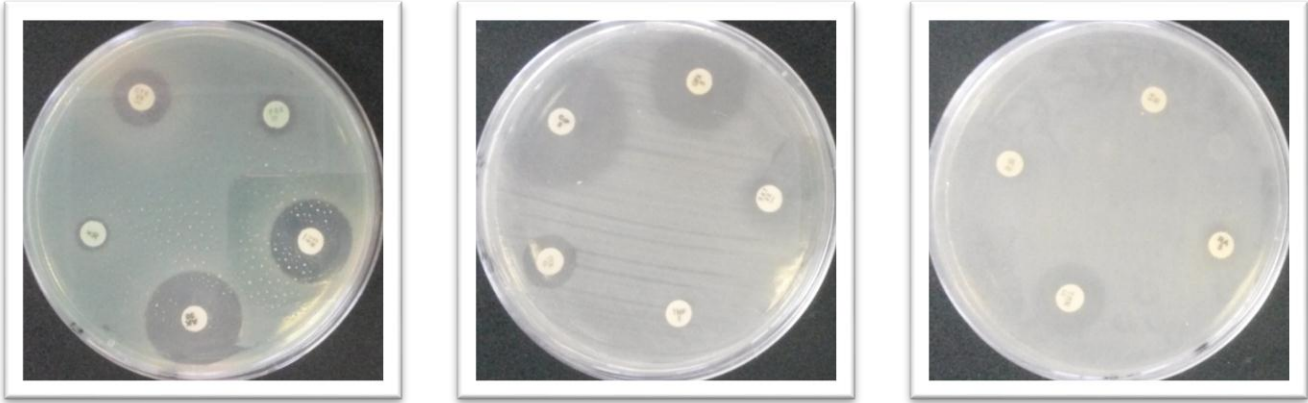
Enterobacter cloacae



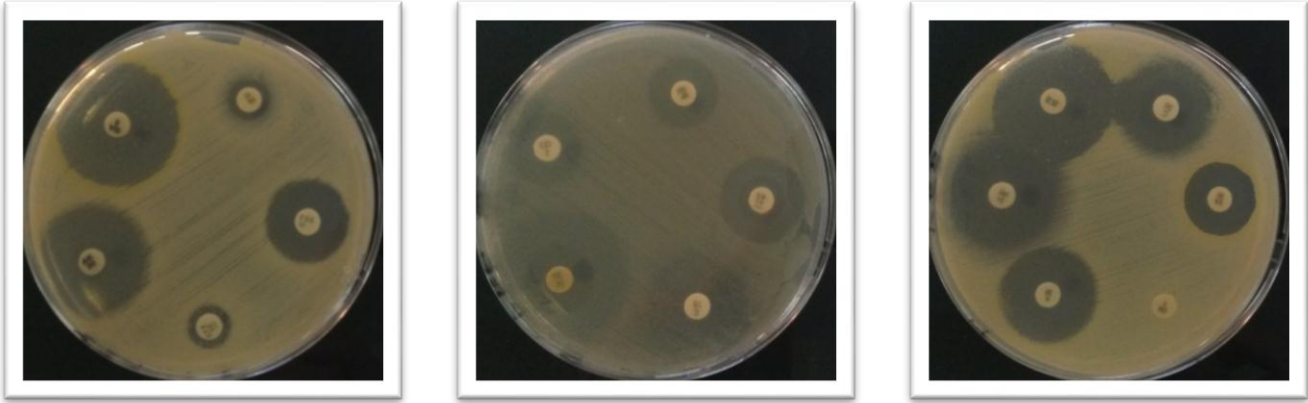
Proteus mirabilis



Escherichia hemanii

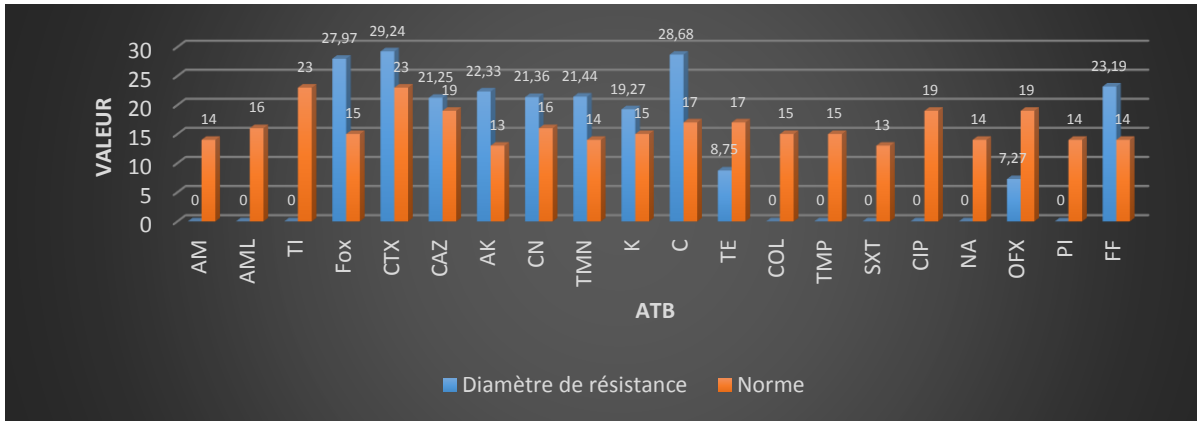


Pseudomonas aeruginosa

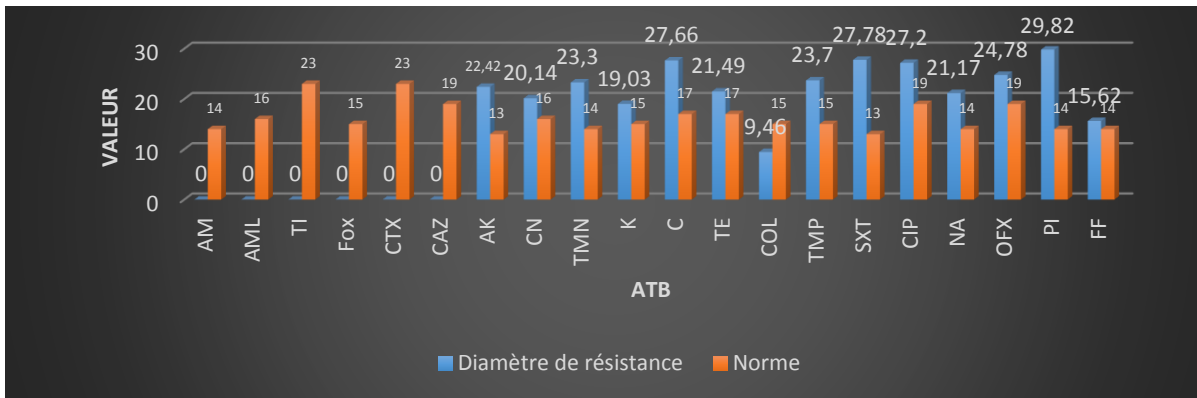


Staphylococcus aureus

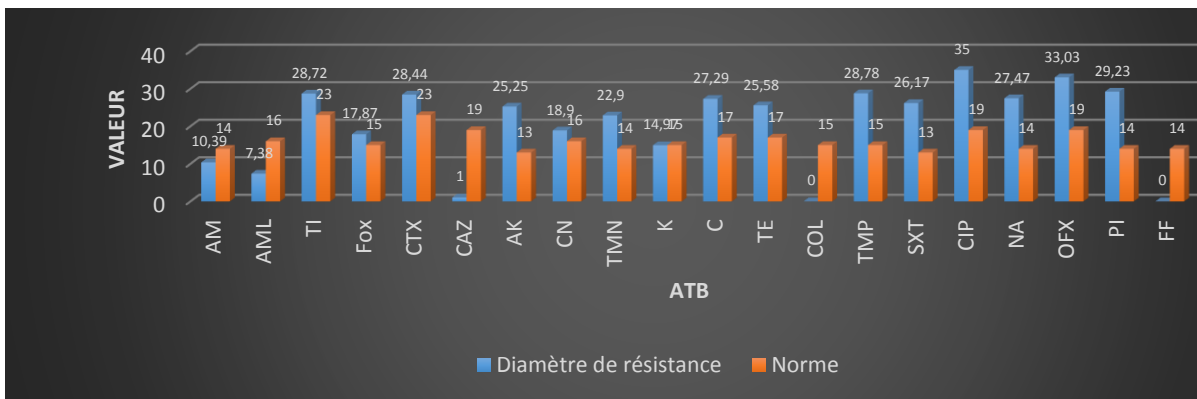
figure n° 18: Résultats de l'antibiogramme des bactéries étudiées



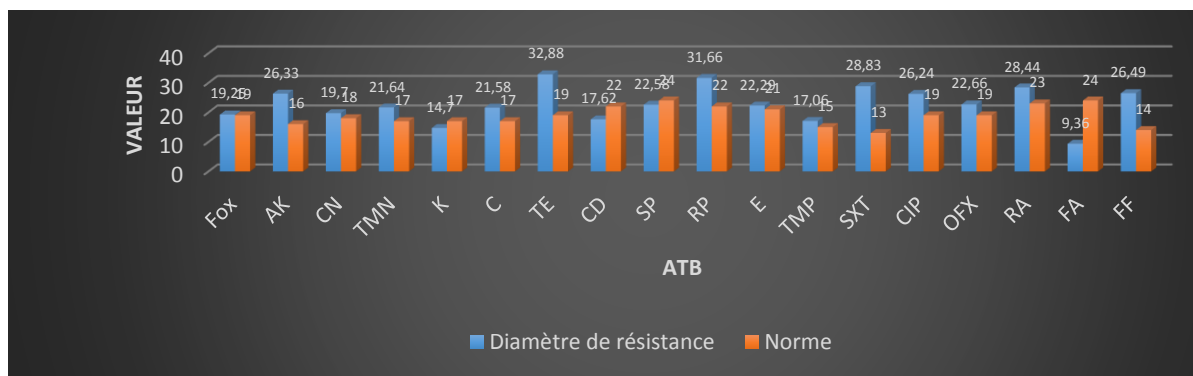
E.coli



Citrobacter braakii



Morganella morganii



Staphylococcus aureus

Figure n° 19: Evaluation de la résistance aux antibiotiques des quatre bactéries étudiées

IV-3- Effet antibactérien des huiles essentielles de *Artemisia herba alba* et de *Pistacia lentiscus L*

IV-3-1- Extraction des huiles essentielles de *Artemisia Herba Alba* et de *Pistacia lentiscus L*

Après une durée de 1 heure et 30 minutes d'hydrodistillation pour *Artemisia herba alba* et 6 heures pour *Pistacia lentiscus L* (Figure n° 19) de 200 g de matière végétale, on a obtenu des quantités des huiles essentielles illustrés dans le tableau n° 8 et 9 et cela nous a permis de calculer le rendement (R) de l'extraction selon la formule suivante (Vagi et al. 2005).

$$R = \frac{\text{Masse d'huile essentielle (g)}}{\text{Masse du matériel végétal utilisé (g)}} \times 100$$

Tableau 8: Quantité des huiles essentielles obtenues par hydrodistillation de *Artemisia herba alba*

Essais N°	Masse du matériel végétal utilisée en g	Volume d'eau distillée utilisée en ml	Masse des huiles essentielles extraites en g
01	200	1500	1,0165
02	200	1500	0,864
03	200	1500	1,321

$$R1 = \left[\frac{1,0165g}{200g} \times 100 \right] = 0,508\%$$

$$R2 = \left[\frac{0,864g}{200g} \times 100 \right] = 0,432\%$$

$$R3 = \left[\frac{1,321g}{200g} \times 100 \right] = 0,660\%$$

$$R = \frac{R1+R2+R3}{3} = \frac{0,508+0,432+0,660}{3} = \frac{1,6005}{3} = 0,53\%$$

$$R = 0,53\%$$

Tableau 9: Quantité des huiles essentielles obtenues par hydrodistillation de *Pistacia lentiscus L*

Essais N°	Masse du matériel végétal utilisée en g	Volume d'eau distillée utilisée en ml	Masse des huiles essentielles extraites en g
01	200	1500	0,420
02	200	1500	0,415
03	200	1500	0,435

$$R'1 = \left[\frac{0,300g}{200g} \times 100 \right] = 0,21\%$$

$$R'2 = \left[\frac{0,415g}{200g} \times 100 \right] = 0,20\%$$

$$R'3 = \left[\frac{0,435g}{200g} \times 100 \right] = 0,22\%$$

$$R' = \frac{R'1+R'2+R'3}{3} = \frac{0,21+0,20+0,22}{3} = \frac{0,63}{3} = 0,21\%$$

$$R' = 0,21\%$$

Comparativement aux travaux de (Mengal et Mompon, 1994) et afin de mettre en place un protocole applicable à la plante choisie et d'optimiser le rendement de l'extraction tout en conservant la qualité des huiles essentielles, plusieurs expériences préliminaires ont été menées sur le *Pistacia lentiscus L*. La masse de matière végétale traitée, la durée de l'hydrodistillation, ainsi que la quantité d'eau à utiliser sont les paramètres qui ont été modifiés au fil des expériences dans le but de trouver le meilleur compromis entre chacun d'eux.

La quantité d'eau au sein du ballon était quasiment la même tout au long de la distillation.

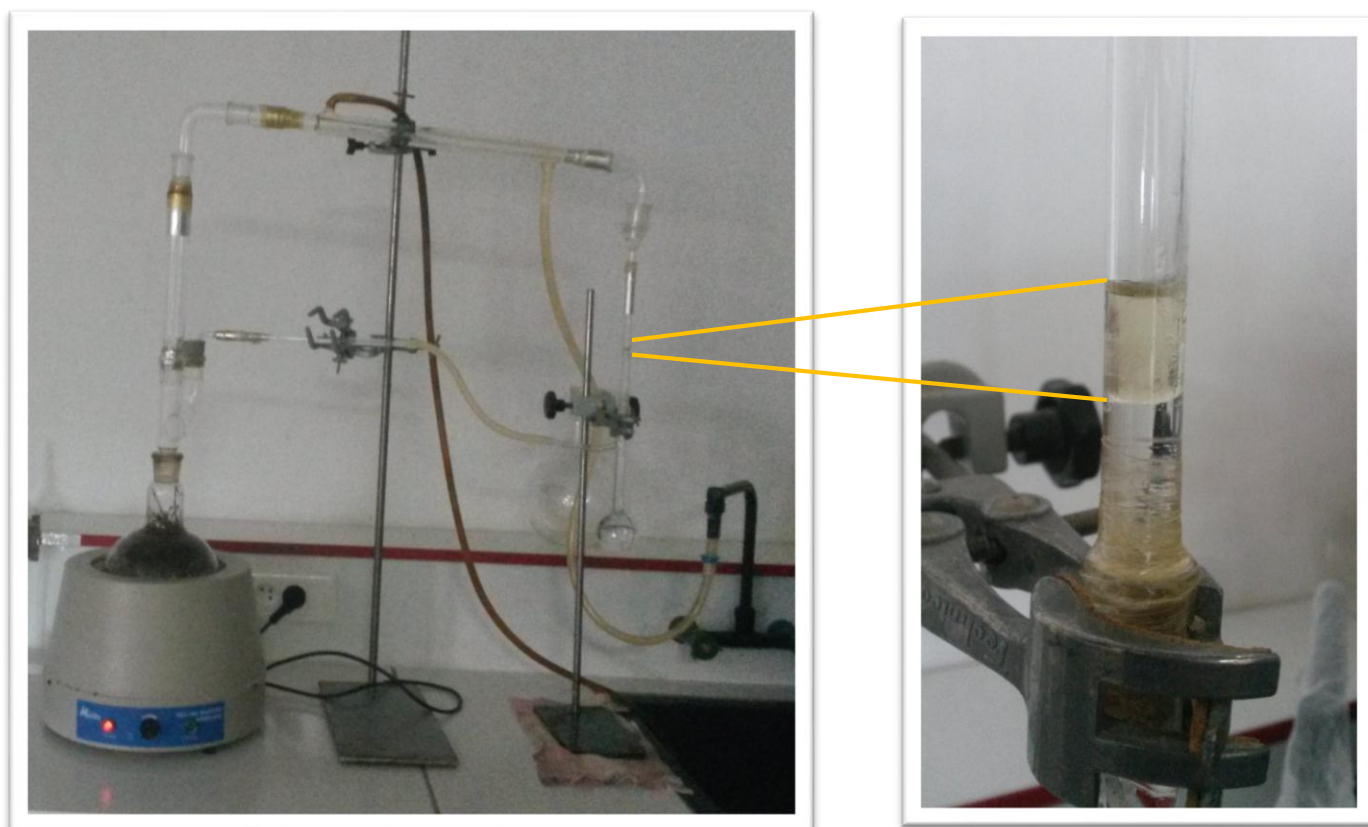


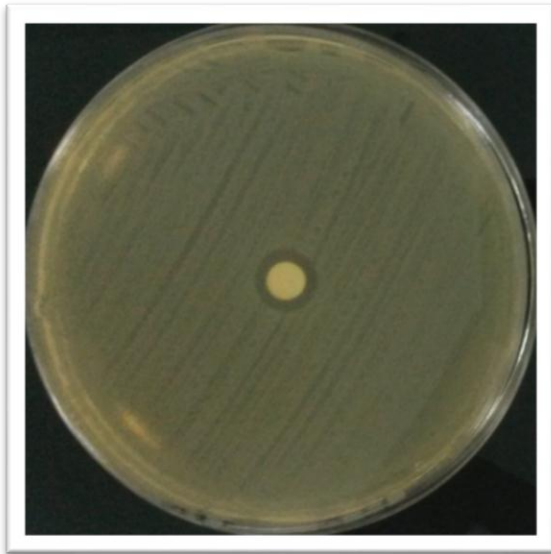
Figure n° 20 : Extraction des huiles essentielles de *Artemisia herba alba* et *Pistacia lentiscus L* par hydrodistillation

IV-3-2- Activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Artemisia herba alba* et de *Pistacia lentiscus L* vis-à-vis des bactéries étudiées

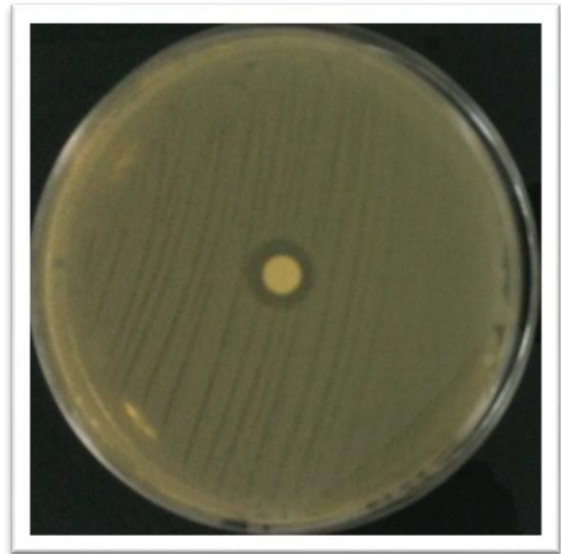
Le tableau n°10 et les figures n°21 et 22 montrent les résultats de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Artemisia herba alba* et *Pistacia lentiscus L*. On note que les huiles essentielles de *Pistacia lentiscus L* ont exercés une forte activité antibactérienne contre les bactéries étudiées (dont le diamètre de la zone d'inhibition été 26,40 mm pour *E.coli*, 24,60 mm pour *Morganella morganii*, 23,54 mm pour *Staphylococcus aureus* et 15,32 mm pour *Citrobacter brakii*) par rapport aux huiles essentielles de *Artemisia herba alba* (11,79 mm pour *Citrobacter brakii*, 11,63 mm pour *Morganella morganii*, 10,48 mm pour *E.coli* et 9,68 mm pour *Staphylococcus aureus*).

Tableau 10: Résultats de l'effet inhibiteur des huiles essentielles de <i>Artemisia herba alba</i> et de <i>Pistacia lentiscus L</i> via-à-vis des bactéries étudiées		
Bactéries étudiées	Diamètre de la zone d'inhibition en mm	
	<i>Artemisia herba alba</i>	<i>Pistacia lentiscus L</i>
<i>E.coli G 1</i>	10,48	26,40
<i>Citrobacter brakii</i>	11,79	15,32
<i>Morganella morganii</i>	11,63	24,60
<i>Staphylococcus aureus</i>	9,68	23,54

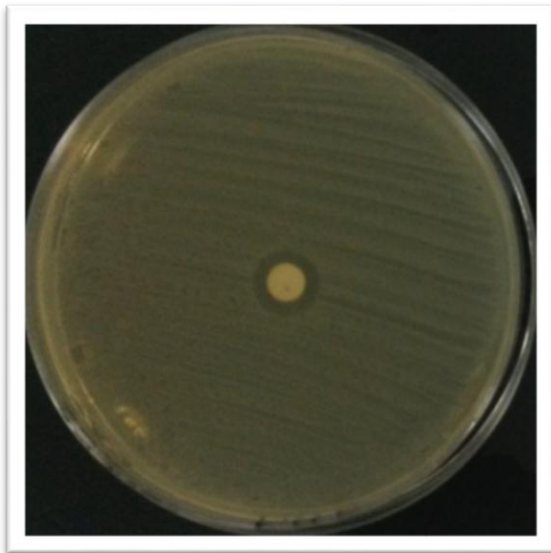
L'étude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles des plantes étudiées a été faite pour les bactéries ayant une résistance aux antibiotiques testés.



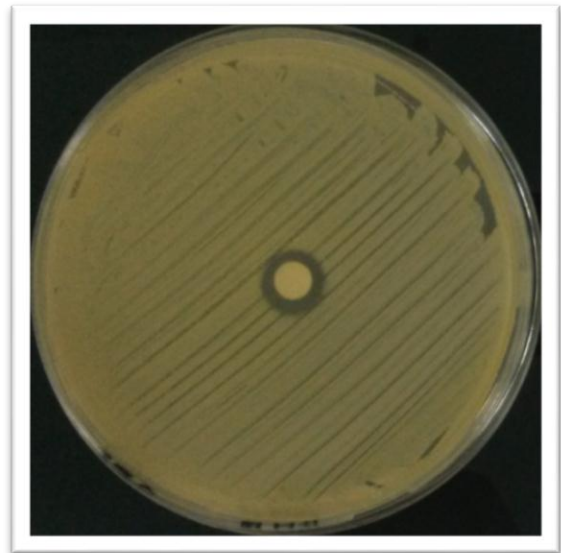
E.coli G1



Citrobacter brakii

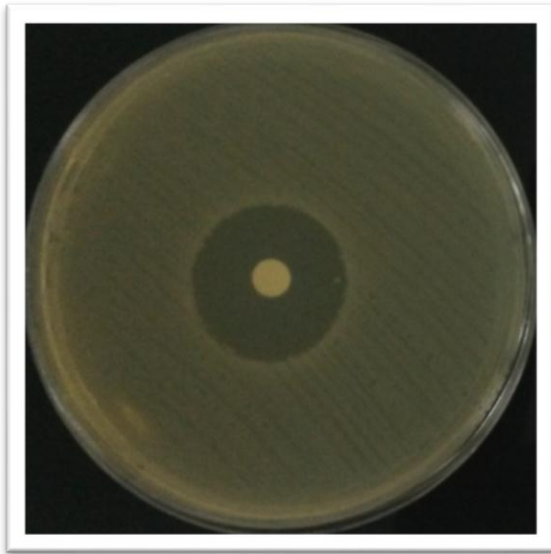


Morganella morganii

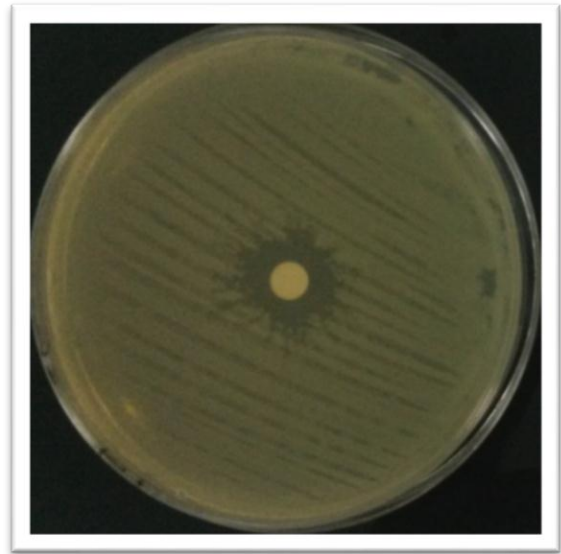


Staphylococcus aureus

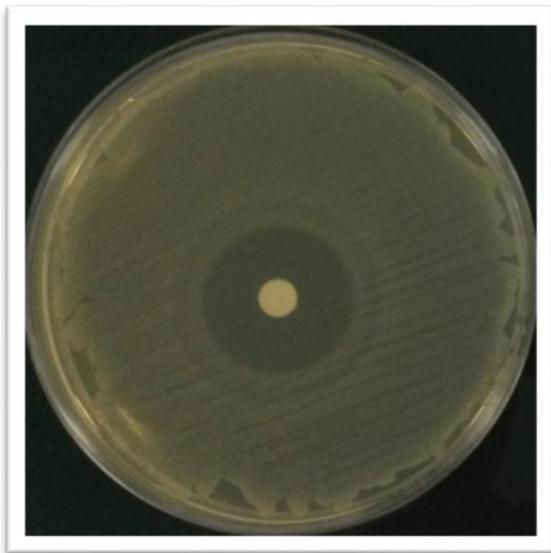
Figure n° 21 : Résultats de l'effet des huiles essentielles de *Artemisia herba alba* sur les bactéries résistantes aux antibiotiques



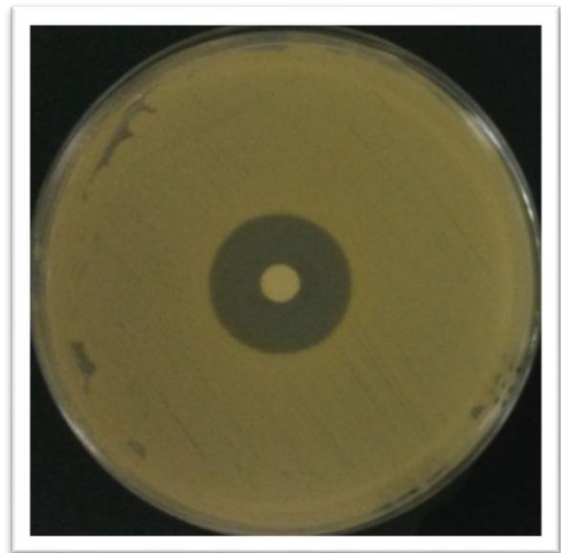
E.coli G1



Citrobacter brakii



Morganella morganii



Staphylococcus aureus

Figure n° 22 : Résultats de l'effet des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus L* sur les bactéries résistantes aux antibiotiques

IV-3-3- Détermination de la CMI des huiles essentielles en milieu liquide

Les résultats obtenus par la méthode de diffusion en disque nous ont conduits de faire confirmer quantitativement l'activité antibactérienne des huiles essentielles vis-à-vis des quatre bactéries étudiées.

Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau n° 11 et figures n° 23 et 24

IV-3-4- Détermination de la CMB des huiles essentielles en milieu solide

Le repiquage sur gélose Mueller Hinton sans huiles essentielles des tubes dont les concentrations supérieures à celle de la CMI, nous a permis d'observer que le nombre de germes portés par les stries des différents tubes correspondants aux concentrations ; de la bactérie étudiée est inférieur ou égal au nombre de germes portés par la strie de la dilution 10^{-4} du tube témoin de croissance (0,01% de survie) le tableau n° 11 et figures n° 25 et 26.

Tableau 11: Résultats de la CMI et la CMB des huiles essentielles testées				
Bactéries	<i>Artemisia herba alba</i>		<i>Pistacia lentiscus L</i>	
	CMI	CMB	CMI	CMB
<i>E.coli G1</i>	1%	10%	0,25 %	4%
<i>Citrobacter brakii</i>	0,5%	4%	1%	10%
<i>Morganella morganii</i>	0,33%	4%	0,33%	2%
<i>Staphylococcus aureus</i>	1%	10%	0,25%	4%

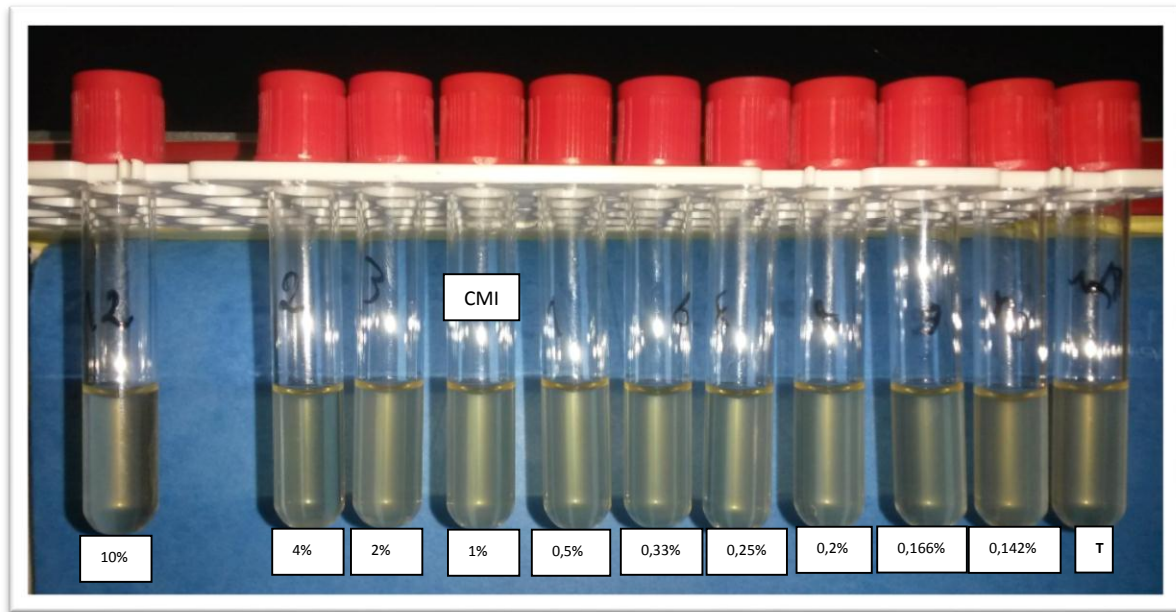


Figure n° 23 : Résultats de la CMI des huiles essentielles de *Artemisia herba alba* en milieu liquide de *E. coli*.

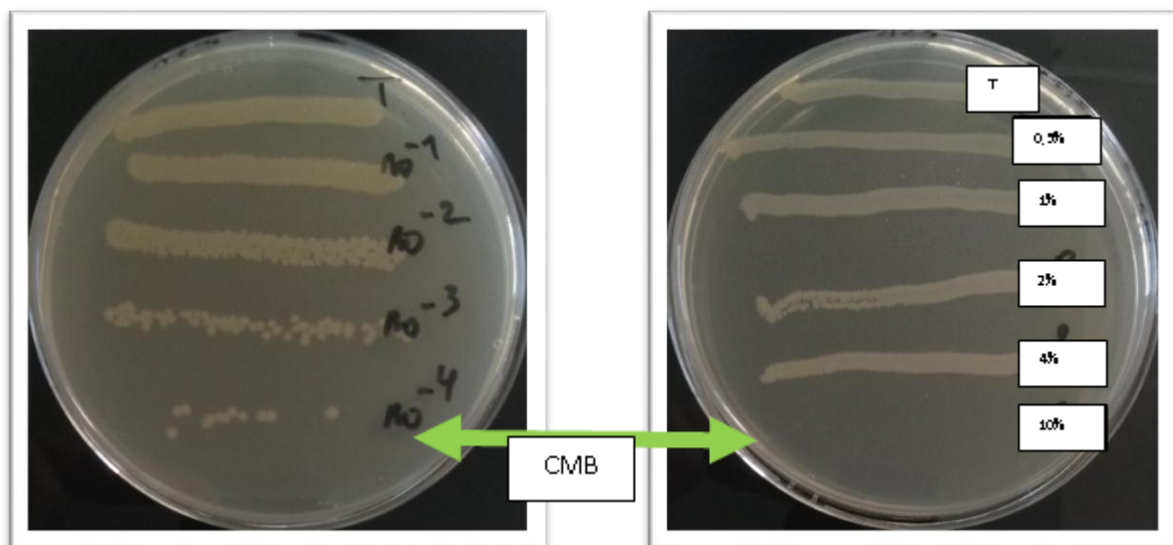


Figure n° 24 : Résultats de la CMB des huiles essentielles de *Artemisia herba alba* pour *E. coli*.

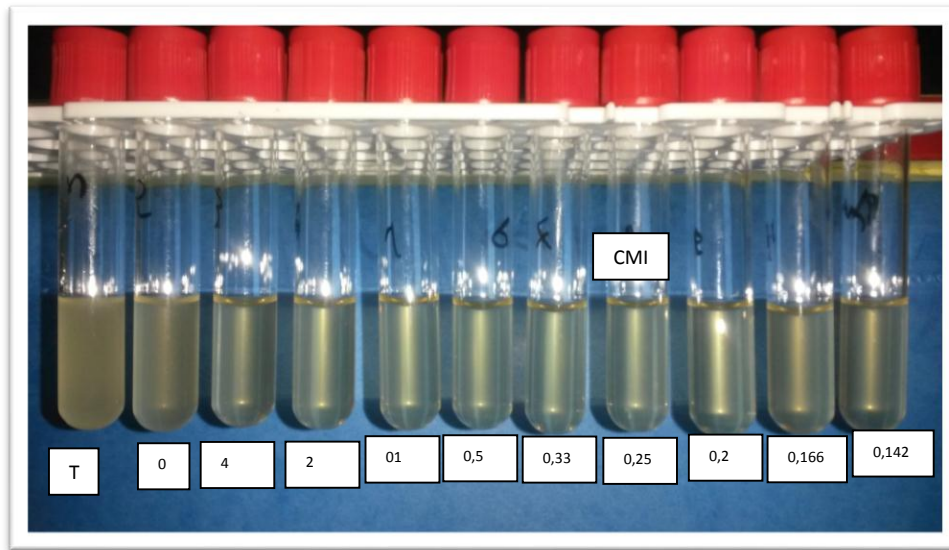


Figure n° 25 : Résultats de la CMI des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus L* en milieu liquide de *E.coli*.

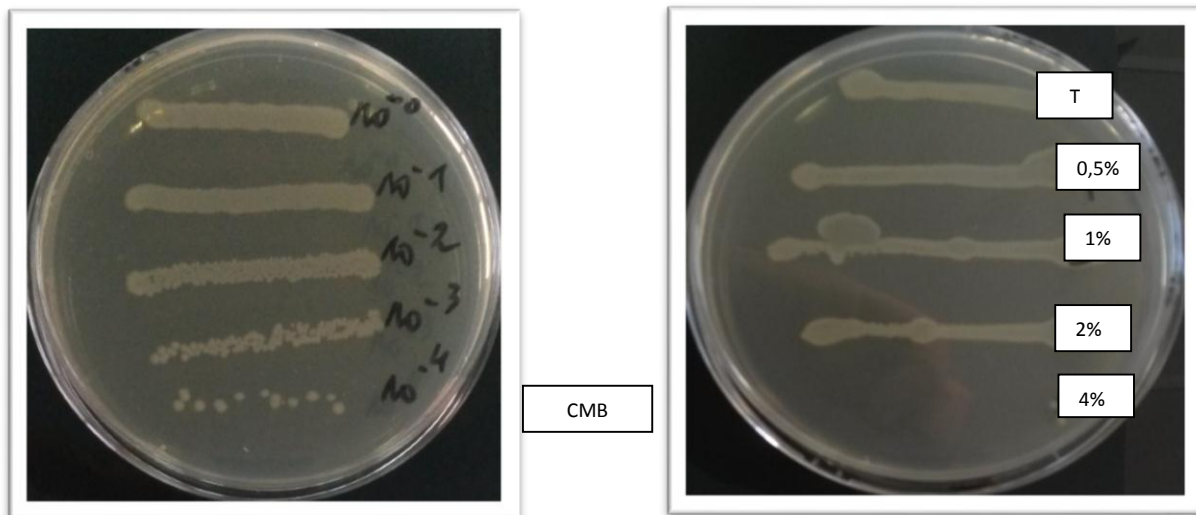


Figure n° 26 : Résultats de la CMB des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus L* de *E.coli*.

L'effet antibactérien a été jugé bactéricide ou bactériostatique en fonction du rapport : CMB/CMI. En effet, si CMB/CMI = 1 à 2, l'effet est bactéricide et si CMB/CMI = 4 à 16, l'effet est bactériostatique (Bercheet al. 1991).

L'effet antibactérien des huiles essentielles de *Artemisia herba alba* était bactericide et bacteriostatique pour *Pistacia lentiscus L* pour *E.coli*.

Discussion

C'est dans le souci de valoriser les plantes aromatiques *Artemisia herba alba* et *Pistacia lentiscus L* dans notre pays que nous avons jugé important d'étudier dans le cadre de ce travail, le pouvoir antibactérien des plantes étudiées vis-à-vis de différentes bactéries du tube digestif relativement résistantes aux antibiotiques habituellement utilisés.

En utilisant la méthode de diffusion sur disque dans la gélose MH, on constate que 40% des bactéries étudiées sont relativement résistantes aux antibiotiques testées selon la recommandation de l'OMS 2002 (standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle national) dont la zone d'inhibition est de 8,75 mm pour la Tétracycline, 8,9 mm pour Colistine et 7,27 mm pour l'Ofloxacin. On constate Aussi, l'absence totale de la zone d'inhibition pour les antibiotiques suivants : l'Ampiciline, l'Amoxiciline, la Ticarcylone, la Triméthoprime, la Triméthoprime+sulfamide, la Ciprofloxacine, l'Acide nalidixique et l'Acide pipemidique pour *E.coli*.

Concernant *Citrobacter brakii*, les résultats montrent que la zone d'inhibition est de 9,47 mm pour la Colistine et une absence de la zone d'inhibition pour ; l'Ampiciline, l'Amoxiciline, la Ticarcylone, la Cefoxitine, la Cefotaxime et la Ceftazidime.

Les résultats montrent dans le cas de *Morganella morganii*, que la zone d'inhibition est de 10,39 mm pour l'Ampiciline, 7,38 mm pour l'Amoxiciline, 14,96 mm pour la Kanamycine et une absence de la zone d'inhibition pour la Colistine et la Fosfomycine.

Enfin, pour le cas de *Staphylococcus aureus*, la zone d'inhibition est de 19,25 mm pour la Cefoxitine, 19,7 mm pour la Gentamycine, 17,62 mm pour la Clindamycine, 9,36 mm pour l'Acide fusidique et 16,24 mm pour la Vancomycine.

Dans notre travail, les huiles essentielles utilisées ont été extraites à partir des feuilles et rameaux des plantes *Artemisia herba alba* et *Pistacia lentiscus L* par la méthode d'hydrodistillation, cette dernière nous a permis de récupérer un rendement en huiles essentielles de 0,53% pour *Artemisia herba alba*, il est relativement inférieur à celui des huiles essentielles extraites de la même espèce récoltée dans la région de de Biskra (0,95%) (**Bezza et al. 2010**) et de M'sila (1,02%) (**Dob et Benabdelkader. 2006**) en Algérie. Matmata en Tunisie (0,65%) (**Akrout. 2004**) et Il est sensiblement inférieur à celui de la Jordanie (1,3%) (**Hudaiba et Aburjai. 2006**). Par contre, le taux de rendement de HE de l'espèce *Artemisia herba alba* varie en fonction de la période de récolte dans la région du Guerçif au Maroc ; il est entre 0,56% et 1,23% (**Ghanmi et al. 2010**) ; en Espagne, il varie selon les provenances, de 0,41% à 2,30% (**Salido et al. 2004**).

Pour *Pistacia lentiscus L*, La valeur du rendement obtenue pendant notre expérimentation était de 0,21 %, tandis que celle relatée dans la littérature avait une valeur allant de 0,28% à 0,30%. Les résultats ont montré un écart de 0,07%, ceci est peut-être dû d'après (**Zrira et coll. 2003**), à différents facteurs ; géographiques (latitude et longitude), climatiques (température, humidité), la durée diurne, la fertilité du sol ayant un rôle important dans la production de ces huiles essentielles.

L'évaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion en disque vis-à-vis des quatre bactéries relativement résistantes aux antibiotiques montre que les huiles essentielles de *Pistacia lentiscus L* ont exercés une forte activité antibactérienne contre les bactéries étudiées (dont le diamètre de la zone d'inhibition été 26,40 mm pour *E.coli*, 24,60 mm pour *Morganella morganii*, 23,54 mm pour *Staphylococcus aureus* et 15,32 mm pour *Citrobacter brakii*) par rapport aux huiles essentielles de *Artemisia herba alba* (11,79 mm pour *Citrobacter brakii*, 11,63 mm pour *Morganella morganii*, 10,48 mm pour *E.coli* et 9,68 mm pour *Staphylococcus aureus*).

D'après les résultats de ces travaux nous pouvons dire que la zone d'inhibition d'une huile essentielle peut être affectée par sa volatilisation, sa solubilité et par son degré de diffusion dans la gélose. Ceci peut donc expliquer les faibles zones d'inhibition révélées dans nos résultats.

Au cours de nos investigations, l'activité antimicrobienne a été évaluée en observant le pouvoir inhibiteur de nos échantillons des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus L* et *Artemisia herba alba* sur les bactéries a testées. En effet les huiles essentielles de *Pistacia lentiscus L* ont montré une importante activité inhibitrice contre les microorganismes étudiés. *Citrobacter brakii* a été inhiber a la concentration minimale inhibitrice (CMI) de 1/1000 v/v, *Morganella morganii* a la concentration 1/3000 v/v, *E.coli* et *Staphylococcus aureus* a la même concentration qui est de 1/4000 v/v.

Ceci est en accord avec les investigations de plusieurs auteurs.

Pour la méthode de dilution afin de déterminer la CMB on constate l'absence de la croissance des quatre bactéries au niveau de la solution mère et dans les dilutions 1/250 v/v, 1/500 v/v successivement pour les bactéries *Citrobacter brakii*, *E.coli* et *Staphylococcus aureus*, *Morganella morganii*.

Les huiles essentielles de *Artemisia herba alba* ont montré une activité inhibitrice contre les microorganismes étudiés. *Citrobacter brakii* a été inhiber a la concentration minimale inhibitrice (CMI) de 1/2000 v/v, *Morganella morganii* a la concentration 1/3000 v/v, *E.coli* et *Staphylococcus aureus* a la même concentration qui est de 1/1000 v/v.

Ceci est en accord avec les investigations de plusieurs auteurs.

Pour la méthode de dilution afin de déterminer la CMB on constate l'absence de la croissance des quatre bactéries au niveau de la solution mère et dans les dilutions 1/250 v/v, 1/100 v/v successivement pour les bactéries *Citrobacter brakii*, *Morganella morganii* et *Staphylococcus aureus*, *E.coli*.

L'antibiorésistance de ces bactéries est également connu. Il apparait donc de plus en plus urgent de trouver des antibiotiques alternatifs que l'on pourrait non seulement utilisée de traitements des pathologies. Cette utilisation des huiles essentielles des plantes locales à cet effet ne pourrait se faire sans les preuves scientifiques de leur activités d'une part et la croissance de leur propriétés physico-chimique d'autre part ce qui est faite pour le test de leur activité.

Conclusion

L'usage d'extraits de plantes contenant des constituants bio-actifs est devenu une approche très importante dans la médecine préventive, parmi ces extraits naturels les huiles essentielles commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bio-actives notamment dans le traitement des maladies infectieuses. Au cours des dernières décennies, les chercheurs ont publié plus de 2 000 travaux scientifiques portant sur le potentiel thérapeutique de *Artemisia herba alba* et *Pistacia lentiscus L* qui sont parmi les plantes les plus répondues dans la médecine traditionnelle et les plus largement citée dans la littérature pour leur propriétés médicinales. Les huiles essentielles de *Artemisia herba alba* et *Pistacia lentiscus L* constituent les huiles essentielles les plus connus principalement par leur pouvoir antibactérien qui est attribué notamment aux composés sulfides qui les contient

D'après les résultats de nos travaux nous pouvons dire que les huiles essentielles de *Pistacia lentiscus L* ont exercé une forte activité antimicrobienne vis-à-vis des bactéries étudiées par rapport aux huiles essentielles de *Artemisia herba alba*

Référence bibliographiques

A

Alm B., Erdes L. et Möllborg P.,2008. Neonatal antibiotic treatment is a risk factor for early wheezing. *Pediatrics*: p 697-702

Alkhatib R., Joha S., Cheok M., Roumy V., Idziorek T. et Preudho mme C., 2010. Activity of ladanein on leukemia cell lines and its occurrence in *Marrubium vulgare*. *Planta Med*: p 86–87.

Abbas M., Boudriche D., (2007).Identification et Extraction des Molécules Bioactives de *Pictacia lentiscus L.* et Détermination de Quelques Effets Pharmacologiques, Centre de recherche et de developpement, Sidal, Alger.

Atmani D.,Chaher N., Berboucha M., Ayouni K., Lounis H., Boudaoud H., Debbache N. et Atmani D., (2009). Antioxydant Capacity and Phenol Content of Selected Algerian Medicinal Plants, *J. Elsevier, Food Chemistry: p112/ 303–309*

AFNOR., (1992). Recueil des normes françaises sur les huiles essentielles. Paris.

Akrout A., 2004. Essential oil study of some pastoral plants from Matmata (south Tunisia) [in French]. *Cah. Options. Med*:p 289-292.

Angus S., Amstrong B., Reuck K.M.,1976.international thermodynamic table of the fluid stat: carbon dioxide, vol. 3 .

Arpino P., Prevot A., Serpinet J., Tranchant J., Vergnol A., Wittier P., 1995. Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. Ed. masson, paris.

B

Berg RD., 1996. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol*:p 430-435.

BOUTEKJENET C.,1987. Contribution à l'étude chimique de *Artémisia herba alba*, projet de fin d'étude en génie chimique. Ecole nationale polytechnique Alger.

Benzeggouta N., 2005. Etude de l'activité antibactérienne des huiles infusées de quatre plantes médicinales connues co mme aliments. Mémoire de magister, Université de Constantine, Algérie :p 110.

Bruneton J., 1993. Pharmacognosie, Phytochimie, plantes medicinales, techniques et documentation, 2eme eddition. Lavoisier : p 266-422.

Bernadet M., 1983. Phyto-aromatherapie pratique. Ed. Masson :p 78-89.

Bezager L. et Coll, 1992. Les plantes dans la thérapeutique moderne 6eme edition, Ed. Miloire.4200

Bouchonnet S. et Libong D., 2002. Le couplage chromatographique en phase gazeuse-spectrométrie de masse. Département de chimie, laboratoire des mécanismes réactionnels. Ecole polytechnique.

Basil A., Jimener-carmonna M.M et Clifford A.A., 1998. Extraction of rosemary by superheated water. *Journal of food chemistry*: p 5205-5209.

Baudiere A., Monange Y., Gauquelin Th., 2002. Le monde des plante intermediaire des bootanistes, Toulouse,477 :p 2-5.

Belleti N., Nidagijimana M., Sisto C., Guerzoni M.E., Lanciotti R. et Gardini F., 2004. Evaluation of the antimicrobial activity of citrus essences. *Journal agricultural food chemistry*,52: p 6932-6938.

Bezza L., Mannarino A., Fattarsi K., Mikail C., Abou L., Hadji-Minaglou F. et Kaloustian J., 2010. Chemical composition of the essential oil of *Artemisia herba-alba* issued from the district of Biskra (Algeria). *Phytothérapie*, 8, 5 :p 277-281.

Bactériologie médicale (techniques usuelles), edition elsevier masson :p 8/11/22.

Baudoux D., (2003). L'aromathérapie : Se soigner par les Huiles Essentielles, édition Amyris :p 145-146.

C

Canani RB., Cirillo P. et Roggero P.,2006. Therapy with gastric acidity inhibitors increases the risk of acute gastroenteritis and co mmunity-acquired pneumonia in children. *Pediatrics* 117: p817—20

Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C., Gustafson J.E., Warmington J.R. et Wyllie S.G., 2000. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology* 88: p 170-175.

Chami F., 2005. Evaluation *in vitro* de l'action antifongique des huiles essentielles d'origan et de girofle et de leurs composés majoritaires *in vivo* application dans la prophylaxie et le traitement de la *Candidose Vaginale* sur des modèles de rat et de souris immunodéprimés. *Thèse de doctorat*, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. Fès, Maroc: p266.

Charef M., Yousfi M., Saidi M., Stocker P., (2008). Détermination of the Fatty Acid Composition of Acorn (*Quercus*), *Pistacia lentiscus* Seeds Growing in Algeria, Springerlink.

Caree P., (1953). Précis de technologie et de chimie industrielle. Ed. Ballière JB. et fils.

Catherine D., 2006. Bactériologie : P54

Cavalli J F.,2002. Caractérisation par CPG/IK, CPG/SM et RMN du carbone- 13 d'huile essentielle de Madagascar. Thèse de Doctorat de l'université de Corse.

Caillet S. et Lacroix M., 2007. Les huiles essentielles ;leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaires. INRS- Institut Armand Frappier : p1-8.

Cox S D., Mann C M., Markhan J L., Bell H C., Gustafson J F., Warmington J R. et Wyllie S G.,2000. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Malalence alternifolia*. *Journal of applied Microbiology*: P 170-175.

Croteau R., Kutchan T.M. et Levis N.G.,2000. Natural products. *Biochemistry and molecular biology of plants*: p 1250-1268.

Cordero C., Bicchi C., Joulain D., Rubiolo P.,2007. Identification quantitation and method validation for the analysis of suspected allergens in fragrances by comprehensive two-dimensional GC coupled with quadrupole MS and with FID. *J chromatographie* : p 37-49.

D

Degryse A.C., Delpla I. & Voinier M.A., 2008. Risques et bénéfices possibles des huiles essentielles. *Atelier santé environnement -IGS- EHESP* :p 87.

Dapkevicius A., Venskutonis R., Van Beek T.A. et Linssen J.P.H.,1998. Antioxydant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *Journal of science food and agriculture*: p 140-146.

Delaveau P., Larrain M., Mortier F., Rivolier C., Sche Weltzer A.R.,1985. *Secrets et vertus des plantes medicinales*, Ed. selection du reader's Digest, paris.

Davidson P.M.,2007. Methode for testing the efficacy of food antimicrobial, food technology: p 148-155.

Dob T. et Ben Abdelkader T., 2006. Chemical composition of the essential oil of *Artemisia herba-alba* grown in Algeria. *J. Essen. Oil Res.*,18:p 685-690.

Danielle clave 2011. *Bacteriologie*:p 111

Danielle clave 2006. *Bacteriologie*:p 113

Danielle clave 2013. *Bacteriologie*:p 131

E

Emilie Camberlein, PhD., 2013. *Bacteriology, Antibiotique – Synthèse des protéines, Synthèse d'acide nucléique et métabolisme*.

Eckert C.A. et Knutson B.L., 1993. Molecular charisma in supercritical fluids. *Fluid phase equilibri* : p 93-100.

F

Francho mme P., Penoel D., 1990. *L'aromatherapie exactement*. Encyclopedie de l'utilisation therapeutique des huiles essentielles. Roger Jallois editeur. Limoges :p 445.

Fisher K., Rowe C. et Philips C., 2007. The survival of three strains of *acrobacter butzleri* in the presence of lemon orange and bergamot essential oils and their components in vitro and food. *Letters in applied microbiology*: p 44, 495-499.

G

Gilles W.,(1976).L'Encyclopédie des Médecines Naturelles et des Secrets de Santé, Elina, Lavoisier,Paris :p 212-222

Grosjean N., (2007). L'Aromathérapie, édition Eyrolles : p 163

Ghanmi M., Satrani B., Aafi A., Ismaili M.R., Houtia H., Manfalouti H., Benchakroun K., Abarchane 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* :p 8, 5, 295-301.

Gharabi Z. Saud R L ., 2008. *Artemisia herba alba* . a guide to medicinal plants in north Africa: p 49.

Garnero J.,1991. Les huiles essentielles, leur obtention, leur composition, leur analyse et leur normalisation. Ed. encyclopedie des medecine naturelles. Paris. France : p 2-20.

H

HANSON LÅ., YOLKEN RH., 1999 .Probiotics, other nutritional factors, and intestinal microflora. Nestlé Nutrition Workshop series, Nestec Ltd, Vevey/Lippincott-Raven pub., Philadelphia; 42 :p 306.

Hooper LV.,2004. Bacterial contributions to mammalian gut development. *Trends Microbiol*,12:p 129.

Hildebrand H, Malmberg P, Askling J, Ekbohm A, Montgomery SM.,2008. Early-life exposures associated with antibiotic use and risk of subsequent Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* :p 1-6.

Hudaiba M. et Aburjai T.,2006. Composition of the essential oil from *Artemisia herba-alba* grown in Jordan. *J. Essential Oil Res* :p 301-304.

I

Iserin P., (2001). Encyclopédie des Plantes Médicinales, Identification, Préparation, Soins 2ième édition Ed Larousse/VUEF : p13-16/ 250/ 291-296.

K

Kim N.S. et Lee D.S.,2002. Comparaison of different extraction methods for the analysis of fragrances from *Lavandula* species by gas chromatography mass spectrometry *journal of chromatography*:p 31-47.

L

- LE MINOR L., VERON M., 1989. Bactériologie Médicale, Flammarion : p 1107.
- Legrand G., 1993. Manuel de préparation en pharmacie, Masson, Paris.
- Legrand G., 1978, manuel préparatoire en pharmacie, 8ème édition. Ed. Masson. Paris.
- Lis-Balchin M., 2002. Lavender : the genus *Lavendula*, Taylor and Francis, London : p 37-40.
- Lemire N., 2000. Gazette thérapeutique. Ed Atlas: p26-30.
- Leonti M., Casu L., Sanna F., Bonsegno L., (2001). A Comparison of Medicinal Plant Use in Sardinia and Sicily, *De Materia Medica*, Italy.
- Longo L., Scardino A., Vasapollo G., (2007). Identification and Quantification of Anthocyanins in The Berries of *Pistacia lentiscus* L Elsevier, Italy.

M

- More D. et White J., (2005). Encyclopédie des Arbres plus de 1800 Espèces et Variétés du Monde, Flammarion : p18 -797
- Malecky M., 2007. Métabolisme des terpénoïdes chez les caprins. *Thèse de doctorat*, INRA, UMR 791 Physiologie de la Nutrition et Alimentation, F-75231 Paris : p 30-35.
- Matteucci E, Giampietro O., 2008. Proposal open for discussion: defining agreed diagnostic procedures in experimental diabetes research. *J Ethnopharmacol*:115/ 163–72.
- Maryse archaubaud, danielle clave 2004. Bactériologie: P 43/51.
- Maryse archaubaud, danielle clave 2006. Bactériologie :P 61
- Mitchell A., 1986. Tous les arbres de nos forêts, édition Bordas : p 319.
- More D. et White J., 2005. Encyclopédie des arbres plus de 1800 espèces et variétés du monde, Flammarion : p 18-797
- Meyer B., 1989. Définition. Les matières premières mondiales en compétition avec la production française et européenne, *Rivista Italiana Eppas*, numéro spécial : p 273-281.
- Mengel P., Beh D., Bellido G.M., Monpon B., 1993. Extraction des huiles essentielles par micro onde. *Parfums cosmétiques aromes* : p 66-67.

N

- Nahida S.H. Ansari, A.N Siddiqui., 2012. *Pistacia lentiscus*: A review on phytochemistry and pharmacological properties. *Int J PharmPharm Sci*, Vol 4, Suppl 4 : p 16- 20.

O

Oakes R.S., Clifford A.A., Rayner C.M.,2001. the use of supercritical fluids in synthetic organic chemistry:p 917-941.

P

Prescott, J.F., 2000. Antimicrobial drug resistance and its epidemiology, in *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*, Editor Iowa State University Press: p 27-49.

Prescott, J.F., Baggot J D., et Walker R D., 2000. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. third ed. Iowa State University Press: p 509-14.

Pavel M., Ristić M. and Stević T., 2009. Essential oils of *Thymus pulegioides* and *Thymus glabrescens* from Romania: chemical composition and antimicrobial activity. *J. Serb.Chem. Soc.* 75 :p 27-34.

Papoutis Z., Kassi E., Mitakou S., Aligiannis N., Tsiapara A. et Chrousos GP.,2006. Acteoside and martynoside exhibit estrogenic/antiestrogenic properties. *J Steroid Biochem Mol Biol*:p 63–71.

Pellerin P., 1991. Supercritical fluid extraction of natural raw materials for the flavor and perfume industry.perfume. flavor: p 37-39.

Q

Quezel P. et Santa S.,1962. Nouvelle flore d'algerie et des regions desertiques meridionales, Tome I, centre nationale de la recherche scientifique :p 611.

R

Rhayour K., 2002. Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*. *Thèse de doctorat*. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. Fès, Maroc:p 170.

Roux D., 2008. *Conseil en aromatherapie*. 2eme edition:p 187.

Richard F.,1992. *Manuel des corps gras*, paris, Ed: Lavoisier :p 1228-1242.

Richard H., 1992. *Epices et aromates*. Technologie et documentation Lavoisier. Paris :p 339.

S

Savage DC., 1977. Human intestinal microflora in health and disease.Hentges, DJ.ED:p 55-78.

Shanahan F.,2002. Gut flora in gastrointestinal disease. *Eur.j.Surg.suppl* 587:p 47-52

Seigue A., (1985).*La Forêt Circu mméditerranéenne et ses Problèmes*, Maisonneuve & Larose :p 22- 27/ 137 – 139

Souza E.L., Stamford T.L.M. and Lima E.O., 2006. Sensitivity of spoiling and pathogen foodrelated bacteria to *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil. *Brazilian Journal of Microbiology* 37:p 527-532

Shellie R., Marriott P., Chaintreau A., 2004. Quantitation of suspected allergens in fragrances : evaluation of comprehensive Two-dimensional GC for quality control , flavor and fragrance journal- Wiley online Library, vol 19: p 91-98.

Salido S., Valenzuela L.R., Altarejos J., Nogueras M., Sanchez A. & Cano E. 2004. Composition and infraspecific variability of *Artemisia herba-alba* from southern Spain. *Biochem. Systematics and Ecol* :p 32/ 265-277.

Sacheau Guenael., (2013). Coproculture et Parasitologie des selles au laboratoire de biologie medicale : P 9-11.

T

Tannock G.W., 1995. normal microflora. Chapman et Hall.

Traoré M. C., 2006. Étude de la phytochimie et des activités biologiques de quelques plantes utilisées dans le traitement traditionnel de la dysménorrhée au Mali. *Thèse de doctorat*. Université de Bamako, Mali :p 175.

Tóth E., Tóth G., Máthé I., Blunden G., 2007 Martynoside, forsythoside B, ladanein and 7-acetoxyrolynone from *Ballota nigra* L. *Biochem Syst Ecol*:p 35/ 894–7.

TERRIER C., HANSEN N., RENAUD F., FRENEY J., 1990. Les bacilles à gram négatif non fermentaires autres que *Pseudomonas Lyon pharmaceutique*, [Lyon. Pharm.], vol. 41, 2 :p 125-136

V

Vaya J, Mahmood S., (2006). Flavonoid Content in leaf Extracts of The fig (*Ficus carica* L.), Carob (*Ceratonia siliqua* L.) and Pistachio (*Pistacia lentiscus* L.): p 169-75.

W

WEBOGRAPHIE. www.bacteriologie.net. <http://algerianativeplants.net>

Wendakoon C. N. et Sakaguchi M., 1995. Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *Journal of Food Protection*: p.280-283.

(WWW.biokar-diagnostics.fr)

Y

YALA D., MERAD A.S., MOHAMEDI D., OUAR-KORICHI M.N.,2001.Médecine du Maghreb, n°91 : p5-12

Yahya M., 1992. La thérapie par les plantes communes en Algérie, Ain taya : p59.

Annexes

Tableau 12: Lecture des résultats d'une galerie biochimique API 20

	Substrat	Caractère recherché	Résultats Négative	Résultats positive
ONPG	Ortho-nitrophenylgalactoside	Beta-galactosidase	incolore	Jaune
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Rouge/orangé
LDC	Lysine	Lysine décarboxylase	Jaune	Orangé
ODC	Ornithine	Ornithine décarboxylase	Jaune	Rouge/orangé
CIT	Citrate de sodium	Utilisation du citrate	Vert pâle/jaune	Bleu-vert/vert
H ₂ S	Thiosulfate de sodium	Production d'H₂S	Incolore/grisâtre	Dépôt noir/fin
URE	Urée	Uréase	Jaune	Rouge/orangé
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	Jaune	Marron foncé
IND	Indole	Production d'indole	Jaune	Anneau rouge
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	incolore	Rosé-rouge
GEL	Gélatine de Kohn	Gélatinase	Non diffusion	Diffusion du pigment noir
GLU jaune	Glucose			

MAN	Mannitol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
INO	Inositol			
SOR	Sorbitol			
RHA	Rhamnose			
SAC	Saccharose			
MEL	Melibiose			
AMY	Amygdaline			
ARA	Arabinose	Cytochrome-oxydase	incolore	Anneau violet
Ox	Sur papier filtre			
NO3- NO2	Tube GLU	Production de NO2	Jaune	Rouge
N2	Tube GLU	Réduction au stade N2	Rouge	Jaune

Composition des milieux de cultures utilisées :

Composition gélose nutritive :

- extrait de viande 1,0g
- extrait de levure 2.5g
- peptone 5,0g
- chlorure de sodium 5,0g
- Agar 15,0g
- pH = 7,0

Composition de la gélose Mueller-Hinton :

- Infusion de viande de bœuf : 300,0 ml
- Peptone de caséine:17,5 g
- Amidon de maïs:1,5 g
- Agar: 17,0 g
- pH = 7,4

Composition de la gélose BCP :

- Peptone : 5,0 g
- Extrait de viande de bœuf : 3,0 g
- Lactose : 10,0 g
- Pourpre de bromocrésol : 25 mg
- Agar : 15 g
- (pH = 6,8)
- Eau distillée : 1 Litre

Composition de la gélose Hecktoen :

- protéose-peptone:12,0 g
- extrait de levure : facteur de croissance : 3,0 g
- lactose : critère de différenciation : 2,0 g
- saccharose : critère de différenciation : 12,0 g
- salicine : critère de différenciation : 2,0 g
- citrate de fer III et d'ammonium révélateur d'H₂S : 1,5 g
- sels biliaires : inhibiteur : 9,0 g
- fuchsine acide : inhibiteur : 0,1 g
- bleu de bromothymol : indicateur de pH : 0,065 g

- chlorure de sodium : maintien de la pression osmotique : 5,0 g
- thiosulfate de sodium : précurseur d'H₂S : 5,0 g
- agar : 14,0 g
- pH = 7,6

Composition de la gélose Chapman :

- Peptone : 10,0 g
- Extrait de viande de bœuf : 1,0 g
- Chlorure de sodium : 75,0 g
- Mannitol : 10,0 g
- Rouge de phénol : 0,025 g
- Agar-Agar : 15,0 g
- Eau distillée : 1 Litre
- pH = 7,4

Coloration de Gram :

- Recouvrir la lame d violet de gentiane : 1 minute.
- Jeter le violet de gentiane.
- Recouvrir le lugol : 1 minute.
- Jeter le lugol.
- Décolorer à l'alcool, la lame est tenue inclinée la durée de décoloration à l'alcool est variable selon l'épaisseur de frottis.
- Stopper la décoloration par un nouveau lavage à l'eau.
- Recouvrir la lame de fuchsine diluée, 30 secondes à 1 minute.
- Laver à l'eau.
- Sécher entre deux feuilles de papier filtre, puis à la chaleur.
- Examiner à l'immersion (**Francois et al., 2007**).

Résumé

Plusieurs travaux de recherche ont été concentrés sur les huiles essentielles extraites des plantes aromatiques. Les différents résultats publiés indiquent qu'elles sont douées de plusieurs propriétés biologiques.

Dans ce contexte, nous avons essayé d'évaluer in vitro l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Artemisia herba alba* et *Pistacia lentiscus L.*

L'extraction a été réalisée par hydrodistillation, le rendement a été voisin de 0,53% pour *Artemisia herba alba* et de 0,157% pour *Pistacia lentiscus L.*

Et d'après les résultats obtenus suite à la méthode des disques on peut conclure que l'huile essentielle *Pistacia lentiscus L* a exercé une forte activité antibactérienne contre les bactéries étudiées (dont le diamètre de la zone d'inhibition été 26,40mm pour *E.coli*, 24,60mm pour *Morganella morganii*, 23,54mm pour *Staphylococcus aureus* et 15,32mm pour *Citrobacter brakii*) par rapport aux huiles essentielles de *Artemisia herba alba* (11,79mm pour *Citrobacter brakii*, 11,63mm pour *Morganella morganii*, 10,48mm pour *E.coli* et 9,68mm pour *Staphylococcus aureus*).

Mots clés : Huile essentielle, activité antibactérienne, *Artemisia herba alba*, *Pistacia lentiscus L.*

Abstract

Several research studies have focused on the essential oils extracted from aromatic plants. The different results published indicate that they are endowed with several biological properties.

In this context, we tried to evaluate in vitro antibacterial activity of essential oils of *Artemisia herba alba* L. and *Pistacia lentiscus*

The extraction was performed by steam distillation, the yield was close to 0.53% for *Artemisia herba alba* and 0.157% for *Pistacia lentiscus* L.

And according to the results obtained from the essential method of discs that the oil can be concluded *Pistacia lentiscus* L exerted a strong antibacterial activity against bacteria studied (the diameter of the inhibition zone was 26,40mm to *E. coli*, 24,60mm for *Morganella morganii*, 23,54mm to 15,32mm for *Staphylococcus aureus* and *Citrobacter brakii*) compared with essential oils de *Artemisia herba alba* (11,79mm for *brakii* *Citrobacter*, *Morganella morganii* to 11,63mm, 10,48mm for *E. coli* and 9,68mm for *Staphylococcus aureus*).

Keywords: essential oil, antibacterial, *Artemisia herba alba*, *Pistacia lentiscus* L.