

République Algérienne Démocratique et Populaire

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



جامعة عبد الحميد ابن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة
والحياة

DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

Mémoire de fin d'études
Présenté par

M^{lle} BOUACHRIA Khedidja et AIT HAMOUDA Fetta

Pour l'Obtention du Diplôme de

MASTER EN BIOTECHNOLOGIE ET VALORISATION DES PLANTES

Thème

**Effet antibactérien des huiles Essentielles de la Sauge
(*Salvia officinalis* L.) sur deux souches bactériennes**

Soutenu publiquement le /07/2018

Devant le Jury :

BEKKADA Ahmed	Professeur	Université de Tissemsilet	: Examineur
NEBBACHE Salim	MCA	Université de Mostaganem	: Président
CHADLI Rabah	Professeur	Université de Mostaganem	: Promoteur

Année universitaire 2018/2019

Thème réalisé au Laboratoire pédagogique de microbiologie

REMERCIEMENTS

Notre première gratitude va au tout-puissant (ALLAH) ﷻ, le créateur du tout, pour nous donner la vie, la bénédiction et la force pour accomplir ce travail.

Nous sommes en effet reconnaissants à notre promoteur, Pr. CHADLI Rabah pour ses immenses contributions, critiques constructives, patience, compréhension, conseils, et appui au cours de la réalisation de ce travail.

Ce mémoire n'aurait pas été possible sans ses conseils, son aide, son appui et son encouragement ... Merci et nous sommes extrêmement reconnaissantes.

Nos remerciements s'adressent également au Docteur Mr. NEBBACHE Salim maître de conférences qui nous fait l'honneur d'être le président de jury de ce mémoire. Nous sommes également très honorés de la présence, dans ce jury du Pr. Bekada ahmed en tant qu'examineur. Nous voulons également remercier Mr. Mr BENBOUZIANE Djilali laborantin au laboratoire du Département, il était toujours prêt à nous aider avec les dosages, les analyses, l'extraction et les conseils, ...etc.,

Nos reconnaissances particulières vont à Mr. BOUKHATEM Tawfiq, Doctorant et laborantin au laboratoire de Protection, Valorisation des Ressources Littorales Marines et Systématique Moléculaire, Mme JAHERA et AMINA laborantines au laboratoire de Microbiologie et Biologie Végétale pour nous avoir fourni des souches bactériennes.

Nos remerciements spécifiques de profond de notre cœur vont à tous ceux qui ont contribué de loin ou de près à la finalisation de ce modeste travail, pour leur aide, leur disponibilité et le bon accueil.

Nous voulons également remercier nos amis (es) et collègues de l'Hôpital Che Guevara de Mostaganem et d'Ain Tedles pour leur soutien et leur sympathie.

Nos remerciements vont aussi à notre promotion Biotechnologie et valorisation des plantes 2018/2019.

Fetta et Khedidja

DEDICACES

Je dédie ce travail :

A mon dieu l'unique maître de terre et des cieux

A mes parents ; Ma mère qui m'a donné la vie et cette éducation que j'avais tant besoin qui est toujours présent pour moi.

Mon père qui m'a tout donné, qui s'est battu pour que je puisse étudier dans de très bonnes conditions.

A mes très chers frères : Mohammed et Djamel

A mes très chères sœurs : Nacera, Arbia , Djamila et Fatima Zohra qui m'ont encouragé à finir mes études et aller jusqu'au bout de mes forces . Je leur souhaite tout le bonheur du monde « Que dieu les protègent ». A ma belle sœur Aicha.

A mes amies : Fouzia, Fatta, Naima et Ismahane.

Je le dédie également ce modeste travail à A toute la promotion de Master « Biotechnologie et Valorisation des Plantes » 2018/2019.

Khedidja

Dédicaces

Je dédie ce travail à :

A mon dieu l'unique maitre de terre et des cieux,

Mes très chers parents que dieu les protège pour leurs soutien depuis toujours.

Mes frères : kadi et son épouse malha, abdellah et son épouse sabrina , rabi3 et son épouse nadia et rabah.

Mes sœurs : zoubida et son époux moh, nora, djamilla, hayett et son époux mostapha, fatima et son époux yahia et chaherazed.

Tous Les enfants de mes frères: sarah. sofia. rimas. ranim. alaa. liliane. youcef. yacine. walid. hocam. Karia.

Tous mes amis(es) : dallale, khadidja et wafaa

Je le dédie également ce modeste travail à A toute la promotion de Master « Biotechnologie et Valorisation des Plantes » 2018/2019.

fetta

Résumé

Les huiles essentielles et leurs constituants ont une longue histoire comme agents antimicrobiens, cependant leur utilisation comme additifs antimicrobiens dans le domaine agroalimentaire a été rarement rapportée. Ce travail a pour but d'apporter une contribution à la mise en évidence de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de quelques plantes aromatiques.

Dans un premier temps, cette étude est axée à l'extraction de ces métabolites à partir de plantes autochtones de l'ouest Algérien à savoir *Salvia officinalis L.* par le procédé d'hydrodistillation.

Dans un second temps, notre travail s'est orienté vers la mise en évidence de l'activité antibactérienne de ces huiles sur les souches bactériennes pathogènes, les plus incriminées dans les infections intestinales et nosocomiales (*Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* en employant la méthode d'antibiogramme et aromatochrome. Les huiles faisant l'objet de l'étude ont montré une faible activité antibactérienne sur l'ensemble des souches testées, parmi lesquelles *Staphylococcus* s'est révélée être la plus sensible tandis que *Pseudomonas aeruginosa* est la plus résistante. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) sont déterminées par la méthode de dilutions en milieu solide.

Enfin nous pouvons conclure que l'huile essentielle de *Salvia officinalis L.* exerce un effet antibactérien plus significatif, car le rendement de cette huile avoisine les 0.27 % .

Mots-clés : *Salvia officinalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ; huiles essentielles, CMI.

Abstract

Essential oils and their constituents have a long history as antimicrobial agents, however their use as antimicrobial additives in the agri-food field has been rarely reported. This work aims to make a contribution to the demonstration of the antimicrobial activity of the essential oils of some aromatic plants.

Initially, this study focuses on the extraction of these metabolites from autochthonous plants in western Algeria, namely *Salvia officinalis* L. by the hydrodistillation process.

In a second step, our work was directed towards the demonstration of the antibacterial activity of these oils on the pathogenic bacterial strains, the most incriminated ones in the intestinal and nosocomial infections (*Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*) by using the method of The oils in the study showed low antibacterial activity on all strains tested, of which *Staphylococcus* proved to be the most sensitive while *Pseudomonas aeruginosa* was the most resistant. Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) are determined by the solid-state dilution method.

Finally we can conclude that the essential oil of *Salvia officinalis* L. exerts a more significant antibacterial effect, because the yield of this oil is around 0.27%.

Key Words: *Salvia officinalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*; Oils Essentials, CMI.

ملخص

للزيوت الاساسيه ومكوناتها تاريخ طويل كعوامل مضادة للميكروبات, ولكن نادرا ما تم الإبلاغ عن استخدامها كمضادات مضادة للميكروبات في مجال الأغذية الزراعية . يهدف هذا العمل الى المساهمة في عرض النشاط المضاد للميكروبات في الزيوت الأساسية لبعض النباتات العطرية.

في البداية , تركز هذه الدراسة على استخلاص هذه المركبات من النباتات المحلية في غرب البلاد وتحديدًا :

(*Salvia officinalis* L) بواسطة عمليه التقطير بالبخار

في خطوه ثانيه , تم توجيه عملنا نحو عرض النشاط المضاد للبكتيريا في هذه الزيوت على السلالات البكتيرية المسببة للأمراض أكثرها تجريما في الالتهابات المعوية والمعدية :

(*Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas aeruginosa*) , باستخدام طريقه :

(*d'antibiogramme* و *aromatogramme*)

أظهرت الزيوت الموجودة في الدراسة نشاطا منخفضا مضادا للبكتيريا في جميع السلالات التي تم اختبارها , والتي اثبتت ان *Staphylococcus aureus* الأكثر حساسية , بينما

Pseudomonas aeruginosa هي الأكثر مقاومه.

بواسطة تخفيف الحالة الصعبة MIC يتم تحديد التركيزات المثبطة الدنيا

أخيرا يمكننا أن نستنتج *Salvia officinalis* لها تأثير مضاد للجراثيم مهم, وهذا يعود لغلتها من والتي تبلغ حوالي 0.27 %

كلمات المفتاح

Salvia officinalis, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* .CMI; الزيوت العطرية

Remerciements	
Dédicaces	
Résumé	
Abstract	
Résumé en Arabe	
Liste des Tableaux	
Liste des Photos	
Liste des Figures	
Liste des Abréviations	

Sommaire

Introduction	1
Partie 1 : Synthèse bibliographique	3
Chapitre I : Les huiles essentielles	3
I.1. Historique des huiles essentielles	3
I.2. Définition	4
I.3. Répartition systématique	4
I.4. Localisation des huiles essentielles	5
I.5. Rôle écologique	5
I.6. Procédés d'extraction des huiles essentielles	5
I.6.1 La distillation	5
I.6.2. Hydrodistillation	6
I.6.3 Entrainement à la vapeur d'eau	6
I.6.4. Hydrodiffusion	7
I.6.5. Extraction par les solvants organiques	8
I.6.6. Extraction à froid	8
I.6.7. Extraction au CO ₂ supercritique	9
I.6.8.. Extraction par micro- onde	10
1.7 .Composition chimique des huiles essentielles	11
I.7.1 Les composés terpéniques	12
I.7.2 Monoterpènes	12
I.7.3. Sesquiterpènes	12
I.7.4. Les composés aromatiques dérivés du phenylpropane	13
1.8 Méthodes d'analyses des huiles essentielles	14
I.8.1 .Chromatographie sur couche mince (CCM)	14
I.8.2. Chromatographie en phase gazeuse/Spectrométrie de masse (CPG/SM)	15
I.8.4 Chromatographie liquide à haute performance (HPLC).	16
I.8.5. Résonance Magnétique Nucléaire RMN	16
I.9. Propriétés des HES	17
I.9.1. Propriétés antibactériennes	17
I.9.2 Propriétés antivirales	18
I.9.3. Propriétés antifongiques	19
I.9.4. Propriétés insecticides	19
I.9.5. Propriétés Antioxydants	19
I.10. Toxicité des huiles essentielles	19
I.11. Domaines d'utilisation des huiles essentielles	20
I.11.1 Aromathérapie.	20
I.11.2. Agro-alimentaire	20
I.11.3 Bio-pesticides	20
Chapitre II : Les plantes aromatiques et médicinales (PAM)	21
II. Etude de la Sauge (<i>Salvia officinalis</i> L.	21
II. 1. La famille des Lamiaceae	21
II. .2. Le genre <i>Salvia officinalis</i> L.	21
II. 3.. Description morphologique	21

II. 4. Classification taxonomie	22
II. 5. Répartition géographique	22
II. 6. Propriétés de la sauge et ces utilisations traditionnelles.....	22
II. 7. Composition chimique	23
II. 7.1 Huiles essentielles	23
II. 7.2 Les composés phénoliques :	24
Chapitre III : Les maladies infectieuses	24
III.1. Généralités sur les maladies infectieuses	25
III .1.1 Les maladies infectieuses :	25
III.1.2. La flore microbienne normale chez l'homme	26
III.1.3. Les infections nosocomiales	26
III .2. Généralités sur les microorganismes pathogènes.....	26
III.2.1.. <i>Staphylococcus aureus</i>	26
III.2.1.1..Généralité:.....	26
III.2.1.2.Classification :	27
III.2.1.3. Habitat	27
III .2.1.4 Caractères morphologiques :.....	27
III .2.1.5. Caractéristiques biochimiques:.....	28
III.2.1.6 .Pouvoir pathogène	28
III.2.1.7. Résistance aux antibiotiques	28
III.2.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29
III.2.2.1. Généralités.....	29
III.2.2.2 Classification.....	30
III.2.2.3. .Habitat	30
III .2.2.4. Caractères morphologiques :.....	30
III.2.2.5.Caractéristiques biochimiques.....	31
III.2.2.6..Pouvoir pathogènes	31
III.2.2.7 Résistance aux antibiotiques.....	31
Partie II : Matériel et méthodes.....	32
II.1 Matériel biologique.....	32
II.1.1 Matériel végétal	32
II.2. Méthodes	33
II.2.1. Extraction des HEs de <i>Salvia officinalis L.</i>	33
II.2.2. Dispositif d'extraction des HEs.....	34
II.2.3. Procédé d'extraction des HEs	35
II.2.4. Conservation d'huile essentielle obtenue	35
II.2.5. Détermination du rendement d'extraction	35
II.3. confirmation de l'identification des souches bactériennes	35
II.3.1. Coloration de Gram.....	36
II.3.2. Test de la Catalase	36
II.3.3 Test de l'Oxydase.....	37
II.3.4.Test de l'Antibiogramme.....	37
II.3.5. Préparation de la suspension bactérienne.....	39
II.3.5.1.Ensemencement.....	39
Partie III : Résultats	43
III.1. Tests microbiologique	43
III.2. Confirmation de l'identification des souches pathogènes testées	44
III.2.1. Etude macroscopique	43
III.2.2.Etude microscopique.....	43
III.2.2.1 Coloration de Gram	44

III.2.2.2. Test de catalase	46
III.2.2.3 Test d'oxydase	46
III.3. Test d'antibiogramme	46
III.3.1 L'effet des antibiotiques sur la croissance de <i>Staphylococcus aureus</i>	48
III.3.2 L'effet des antibiotiques sur la croissance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	49
III.4. Résultat d'extraction et rendement en huile essentielle	50
III.5. Résultat du test du pouvoir antibactérien des HEs	51
III.5.1. Résultats de l'Aromatogramme.....	55
III.6. Discussion	55
III.6.1 Rendement en huile essentielle	55
III.6.2. Pouvoir d'activité antimicrobienne	56
III.6.3. Détermination de concentrations minimales inhibitrices (CMI)	57
Conclusion	57
Références bibliographiques	59
Annexes	

Liste des Tableau

Tab. 1 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Salvia officinalis L.* (MILADINOVIC, 2000)

Tab. 2 : Principales classes de composés phénoliques identifiées dans les feuilles de *Salvia officinalis L.* (MILADINOVIC, 2000)

Tab. 3 : Quelques membres représentatifs de la flore normale dans diverses parties du Corps humain (TORTORA *et al.* 2003)

Tab. 4 : La source de souches pathogènes testées

Tab.5 Résultats de l'antibiogramme de *Staphylococcus aureus*.

Tab.6. Résultats de l'antibiogramme de *Pseudomonas aeruginosa*

Tab.7: Détermination des rendements des huiles essentielles M_{HE} en fonction de la quantité matière végétale de (*Salvia officinalis L.*) et du volume de l'eau distillée.

Tab.8: L'effet antimicrobien des huiles essentielles de *Salvia officinalis L.* sur *Pseudomonase aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* sans utilisation de substances émulsifiantes

Tab.9: Concentration de CMI des huiles essentielles aromatiques sur les souches testées.

LISTE DES PHOTOS

Photo1 : *Salvia officinalis* . L poussant dans le campus (ITA)

Photo 2 : Appareil d'hydrodistillation (Clevenger)

Photo 3 : Quantité d'Huile essentielle recueillie dans des flacons

Photo 4 : *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*

Photo 5: la suspension bactérienne

Photo 6 : Aspect macroscopique de *Pseudomonas aeruginosa* ensemencée sur milieu King B et King A

Photo 7 : Aspect macroscopique de *Pseudomonas aeruginosa* ensemencé sur gélose nutritive

Photo 8: Aspect macroscopique de *Staphylococcus aureus* ensemencé sur milieu de Chapman

Photo 9 : Aspect macroscopique de *Staphylococcus aureus* ensemencé sur milieu de gélose nutritive

Photo 10: Observation microscopique de *Pseudomonas aeruginosa* après coloration par un grossissement X (1000) (Gram négatif).

Photo 11 : Observation microscopique de *Staphylococcus aureus* après coloration par un grossissement X(1000). (Gram positif)

Photo 12 : Résultat du test catalase positif de *Pseudomonas aeruginosa* L.

Photo 13 : Résultat du test catalase positif de *Staphylococcus aureus* L.

Photo 14: Résultat du test oxydase positif de *Pseudomonas aeruginosa* L.

Photo15: Résultat du test oxydase négatif de *Staphylococcus aureus* L.

Photo 16 : Effet des antibiotiques sur la croissance de *Staphylococcus aureus* L. sur milieu Mueller Hinton.

Photo 17 : Effet des antibiotiques sur la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* sur milieu Mueller Hinton.

Photo 18 : Les huiles essentielles de la sauge officialisé *Salvia officinalis* L obtenues par l'hydrodistillation.

Photo 19 : Effet de l'huile essentielle des feuilles sèche de la sauge (*Salvia officinalis* L) sur la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* [1] et *Staphylococcus aureus* [2] sur milieux Mueller Hinton.

Liste des Figures

Figure 1 : Schéma du principe de technique d'hydrodistillation (**LUCCHIESI,**

Figure 2 : Schéma du principe de la technique de l'entraînement à vapeur (**LUCCHIESI, 2005**)

Figure 3 : Schéma du système d'extraction des HEs par un fluide supercritique (**BEN AMOR, 2008**)

Figure 4 a: Structure chimique de quelques composés des huiles essentielles (**BAKKALI et al ;2008**)

Figure 4b: Structure chimique de quelques composés des huiles essentielles (**BAKKALI et al ;2008**)

Figure. 5 : Chambre de développement à cuve verticale et plaque de CCM (**ROUESSAC, 2004**)

Figure 6: Photographies de *Salvia officinalis L.*

Fig.7. Test de l'Antibiogramme et de l'Aromatogramme

Fig. 8 : Les étapes du protocole de l'activité antibactérienne

Fig. 9. Ensemencement des bactéries à l'aide d'une anse de platine à partir de suspension à différentes concentrations

Figure 10 : Représentation graphique des diamètre d'inhibition d' *Staphylococcus aureus.* vis -à-vis de différent antibiotiques (Gentamycine(CN), Fosfomycine (FF), Ciprofloxacin(CIP), Tobramycine(TMN), Vancomycine (VA)).

Figure 11 : Représentation graphique des diamètre d'inhibition de *Pseudomonas aeruginosa* vis -à-vis de différent antibiotiques (Fosfomycine (FF), Tobramycine(TMN), Gentamycine(CN), Ciprofloxacin(CIP), Imipénème(IPM) Ceftazidim (CAZ) Oxacilline(OX)).

Figure 11 : Représentation graphique des diamètre d'inhibition de *Pseudomonas aeruginosa* vis -à-vis de différent antibiotiques (**Fosfomycine (FF), Tobramycine(TMN), Gentamycine(CN), Ciprofloxacin(CIP), Imipénème(IPM) Ceftazidim (CAZ) Oxacilline(OX).**)

Introduction

Introduction

Introduction

Les vertus thérapeutiques des essences aromatiques sont connues depuis l'antiquité ; cependant l'intérêt accordé à l'étude scientifique du pouvoir des plantes aromatiques et médicinales n'a augmenté que durant ces dernières années dans le but de rechercher des alternatives aux substances chimiques qui présentent des risques pour la santé humaine et pour l'environnement (Zhang et al, 2010). Plusieurs travaux ont mis en évidence les différentes activités biologiques des plantes aromatiques et médicinales, en particulier leurs pouvoirs antibactériens (Bourkhiss et al, 2007. Magina et al, 2009), antifongiques (Moleyar et al, 1986. Soliman et al, 2002), antioxydants (Bouzouita et al, 2008) et insecticides (Erler et al, 2006). Dans la littérature, les huiles essentielles les plus étudiées pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques appartiennent à la famille des Lamiaceae : Thym, Origan, Sarriette, Lavande, Menthe, Romarin, Sauge, Hysope. Cette activité est due principalement à ces composés majoritaires tels que le thymol, le carvacrol, 1,8-cinéole, p-cymène, α et β pinène (Pellecuer et al, 1980).

Les huiles essentielles (H.E.) sont des substances qui occupent une place particulière dans leur utilisation en médecine, en aromathérapie et en agroalimentaire (ROTA *et al.*, 2008). Nos ancêtres utilisaient des huiles essentielles de certaines plantes comme le lentisque pistachier (*Pistacia lentiscus*), pour la désinfection des carcasses de certains animaux de chasse. Très peu d'études ont été réalisées jusqu'à présent sur les propriétés antibactériennes des plantes et herbes aromatiques d'Algérie.

En Algérie, les maladies d'origine infectieuse qui résultent des contaminées avec des bactéries pathogènes et fongiques constituent une grande préoccupation pour les pouvoirs publics. Généralement, ce genre de problème touche des populations massives. Près de 6000 cas ont été enregistrés par exemple en 2008 à l'échelle nationale. Un chiffre qui pourrait être multiplié par 4 ou 5 du fait qu'il n'y a que les cas d'hospitalisation et de consultations médicales qui sont déclarés et notifiés par les services concernés.

L'évolution des esprits et le refus du "tout chimique" qui se manifeste de plus en plus, ouvrent un peu plus la porte au "retour au naturel". La gravité des toxi-infections, couplée à la tendance des bactéries à résister aux agents antimicrobiens tels que les

Introduction

antibiotiques nous a conduit à nous intéresser à l'inépuisable source de produits naturels à vertu antimicrobien: les plantes médicinales.

Ce travail a pour objet l'extraction et l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'une espèce appartenant à la famille des Lamiacées représentée par la sauge (*Salvia officinalis* L.). Dans le cadre de cette étude, ce mémoire est composé de deux parties. La première partie propose une synthèse bibliographique. Elle est divisée en deux chapitres. Le premier est consacré à la monographie de l'espèce étudiée et propriétés des composés majoritaires. Le second traite les méthodes d'association des antibiotiques. Dans la seconde partie (pratique), nous avons décrit en détail le matériel végétal, puis l'extraction des huiles essentielles et enfin, l'étude de leurs activité antibactérienne. La concentration minimale inhibitrice (CMI) a été déterminée vis-à-vis de certaines bactéries pathogènes entre autres: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Partie I :
Synthèse bibliographique

Chapitre I

Chapitre I : Les huiles essentielles

I.1. Historique des huiles essentielles

Les premières preuves de fabrication et d'utilisation des huiles essentielles datent de l'an 3000 avant J.C. (**BASER et BUCHBAUER, 2010**). Les huiles essentielles semblent donc avoir accompagné la civilisation humaine depuis ses premières genèses. Les égyptiens puis les grecs et les romains ont employé diverses matières premières végétales ainsi que les produits qui en découlent, notamment les huiles essentielles. Ces utilisations concernaient différents domaines : parfumerie, médecine, rites religieux, coutumes païennes, alimentation, etc (**BESOMBES, 2008**).

L'étape byzantine de la civilisation a permis l'instauration des bases de la distillation et, avec la civilisation Arabe, l'huile essentielle devient un des principaux produits de commercialisation internationale. Ainsi, vers l'an mille, Avicenne, médecin et scientifique persan, ont défini précisément le procédé d'entraînement à la vapeur. L'Iran et la Syrie deviennent les principaux centres de production de divers types d'extraits aromatiques (**BASER et BUCHBAUER, 2010**).

Par la suite, les huiles essentielles ont bénéficié des avancées scientifiques, au niveau des techniques d'obtention et de l'analyse de leur composition chimique. Parallèlement, leur utilisation a aussi tiré profit de l'avènement de l'aromathérapie. Le terme de l'aromathérapie a été cité dans de nombreux travaux menés sur les huiles essentielles, notamment leurs propriétés thérapeutiques (**BESOMBES, 2008**).

I.2. Définition

Plusieurs définitions disponibles d'une huile essentielle convergent sur le fait que les huiles essentielles, communément appelées « essences », sont des produits de composition généralement assez complexe, renfermant les principes odorants volatils contenus dans les végétaux (**BRUNETON, 1999**).

Elles diffèrent des huiles fixes (huile d'olive, ...) et des graisses végétales par leur caractère volatile ainsi que leur composition chimique. (**BALZ, 1986**).

Le terme huile essentielle est le parfum des plantes aromatiques. Elle s'appelle aussi « essence » ou « huile volatile », qui est un produit de composition

généralement assez complexe renfermant les principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifient au cours de la préparation (**BRUNETON, 1999**).

Plus récemment, la norme (**AFNOR NF T 75-006 5 février 1998**) a donné la définition suivante d'une huile essentielle : « produit obtenu à partir d'une matière première végétale soit par entraînement à la vapeur soit par procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des citrus soit par distillation sèche ». L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques pour les deux premiers modes d'obtention. Elle peut subir des traitements physiques n'entraînant pas de changement significatif de sa composition (**BRUNETON, 2008**).

I.3. Répartition Systématique

Les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs : il y aurait, selon Lawrence, 17500 espèces aromatiques (**BRUNETON, 2005**), les genres capables d'élaborer des huiles essentielles, ex : Myrtaceae, Lauraceae, Rutaceae, Lamiaceae, Asteraceae, Cupressaceae, Poaceae, Zingiberaceae, Piperaceae,.

Elles peuvent être stockées dans les organes végétaux fleurs, feuilles écorces, bois, racines, rhizomes, fruits et graines (**BRUNETON, 2005. BRAICHE, 1979**).

I.4. Localisation des huiles essentielles

Les Huiles essentielles sont élaborées au sein du cytoplasme de certaines cellules, elles s'en séparent par symétrie sous forme de petites gouttelettes qui confluent ensuite en plages plus ou moins étendues (**DEYSON, 1967**). Les cellules sécrétrices sont soit superficielles, appartenant à l'épiderme (glandes sécrétrices de l'épicarpe de fruit de clémentine), soit sous cutanées, comprises dans des assises définies (Bandelettes sécrétrices situées dans le mésocarpe de fruits de céleri, canaux sécréteurs localisés dans les graines de carvi) (**BOGCHlet STRIVOSTAVA, 2003, SVOLBODA 2003**).

I.5. Rôle écologique

Les huiles essentielles possèdent un rôle écologique lors des interactions végétales, comme agents allélopathiques, c'est inhibiteur de la germination, mais aussi lors des interactions végétal –animal, comme agent de protection contre les prédateurs tels que les insectes (**ACHAK, 2006**).

Les HEs interviennent également, par leurs odeurs caractéristiques, dans l'attraction de pollinisateurs (**FRANCHOMME et al., 1990**).

Les huiles essentielles jouent un rôle dans la conservation de l'humidité des plantes dans les climats désertiques (**BELAICHE, 1979**).

I.6. Procédés d'extraction des huiles essentielles

Le procédé d'obtention des HEs intervient d'une façon déterminante sur sa composition chimique (**GARNERO, 1977**).

Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales, cette diversité est due à la variété des matières premières et à la sensibilité considérable de certains de leurs constituants (**LEGRAND, 1993**).

I.6.1. La distillation

La technique d'extraction des huiles essentielles en utilisant l'entraînement des substances aromatiques grâce à la vapeur d'eau et de loin la plus utilisée à l'heure actuelle.

La méthode est basée sur l'existence d'un azéotrope de température d'ébullition inférieure au point d'ébullition des deux composés. L'huile essentielle et l'eau, pris séparément. Ainsi, les composés volatils et l'eau distillent simultanément à une température inférieure à 100°C sous pression atmosphérique normale. En conséquence, les produits aromatiques sont entraînés par la vapeur d'eau sans subir d'altération majeure (**FRANCHOMME et al., 1990**).

I.6.2. Hydrodistillation

L'hydrodistillation (water distillation), est la méthode la plus simple anciennement utilisée. Le matériel végétal est immergé directement dans un alambic rempli d'eau 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. L'huile essentielle étant plus légère que l'eau surnage au-dessus de l'hydrolat **Fig.1** (LUCCHIESI, 2005).

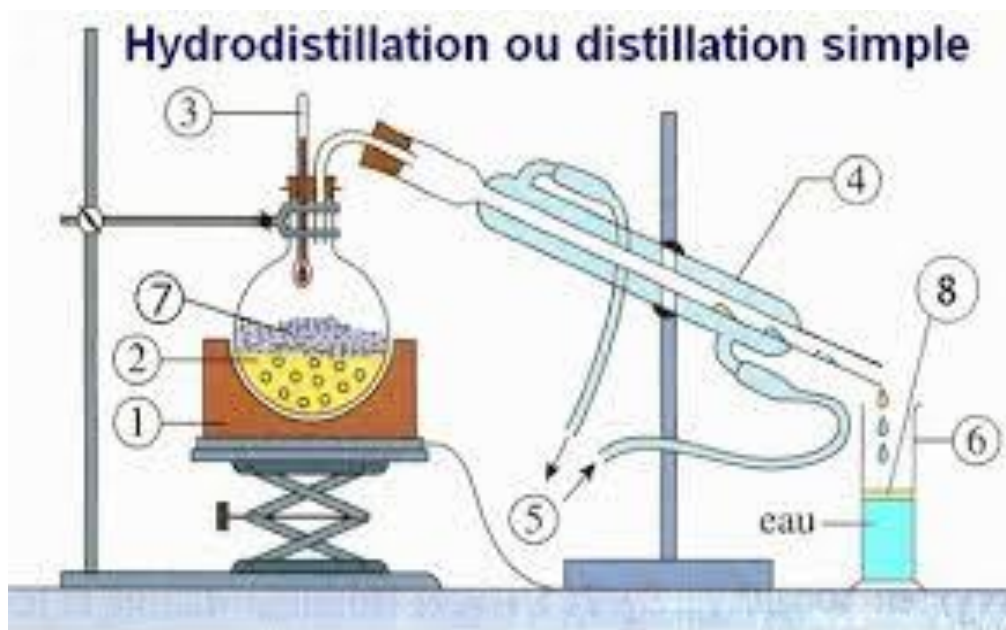


Figure 1 : Schéma du principe de technique d'hydrodistillation (LUCCHIESI,

1-Chauffe ballon ; 2- Ballon ;3-Thermomètre ;4- Réfrigérant ; 5- Entré et Sortie de l'eau ; 6- éprouvette ; 7- Matière l'essence ; 8- la couche d'HE

I.6.3. Entrainement à la vapeur d'eau

Pour éviter certains phénomènes d'hydrolyse des composants de l'huile essentielle ou des réactions chimiques pouvant altérer les résultats de l'extraction. Cette technique n'émet pas en contact direct l'eau et la matière végétale fraîche à traiter. La vapeur d'eau fourni par une chaudière traverse la matière végétale située au dessus d'une grille. Durant le passage de la vapeur à

travers le matériel, les cellules se distendent et les particules d'huiles se libèrent. La vapeur circule et chasse la plupart des composés parfumés volatils, puis traverse un tube froid où elle sera condensée.

Après 3 heures, le distillat est récupéré dans une fiole réceptrice puis séparé en une phase aqueuse et une phase organique (**Fig.2**)(**ROLDAN – GUTIERREZ et al. ; 2008**).

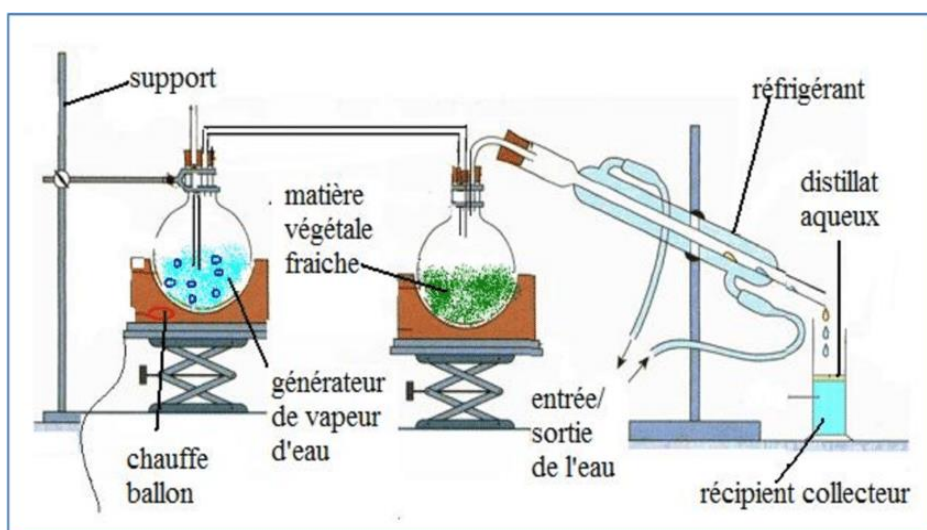


Figure 2 : Schéma du principe de la technique de l'entraînement à vapeur (**LUCHIESI, 2005**)

I.6.4. .Hydrodiffusion

Consiste à pulser la vapeur d'eau à très faible pression (0,02-0,15bar) à travers la masse végétale, de haut vers le bas. La composition des produits obtenus est qualitativement différente de celle des produits obtenus par les méthodes précédentes. Ce procédé permet un gain de temps et d'énergie (**BRUNETON, 1999**).

Cette technique exploite ainsi l'action osmotique de la vapeur d'eau. Le principe de cette méthode réside dans l'utilisation de la pesanteur pour dégager et condenser le mélange « vapeur d'eau-huile essentielle » dispersé dans la matière végétal (**LUCCHESI, 2005**).

I.6.5.Extraction par solvants organiques

Consiste à placer dans un extracteur un solvant volatil et la matière végétale à traiter. Grâce à des lavages successifs, le solvant va se charger en molécules aromatiques, avant d'être envoyé au concentrateur pour y être distillé à pression atmosphérique le produit obtenu est appelé « concrète ». Cette concrète pourra être par la suite brassée avec de l'alcool absolu, filtrée et glacée pour en extraire les cires végétales. Le solvant choisi, en plus d'être autorisé devra posséder une certaine stabilité face à la chaleur, la lumière ou l'oxygène, sa température d'ébullition sera de préférence basse afin de faciliter son élimination, et il ne devra pas réagir chimiquement avec l'extrait. Parmi les solvants utilisés sont le méthanol, l'éthanol et l'éther de pétrole. L'appareillage le plus utilisé est celui de **SOXHLET (LUCCHIESI, 2005)**.

I.6.6. Extraction à froid

Les huiles essentielles des fruits d'agrumes sont des produits fragiles en raison de leur composition en terpènes et aldéhydes. C'est pourquoi, spécifiquement pour cette catégorie de matière première, est utilisé un procédé totalement différent d'une distillation classique qui est l'expression à froid (**LUCCHESI, 2005**).

Le principe de cette technique est basé sur la rupture des parois des sacs oléifères contenues dans l'écorce des fruits; cette essence est ensuite entraînée par un courant d'eau froide. L'émulsion d'essence et d'eau isolée par décantation ou centrifugation (**FERHT et al. ;2007**).

I.6.7.Extraction auCO₂ supercritique

Il s'agit du procédé le plus récent d'extraction à froid, des matières premières végétales utilisant le gaz carbonique sous pression et température supérieur à 35°C, le dioxyde de carbone est employé principalement comme un fluide supercritique

parce que c'est un solvant sain, non-combustible, peu coûteux, inodore, sans couleur, insipide, non toxique, et aisément disponible. Sa viscosité basse lui permet de pénétrer la matrice pour atteindre le matériel à extraire, et sa basse chaleur latente d'évaporation est un moyen élevé de volatilité qui peut être facilement enlevé sans laisser un résidu de solvant (KHAJEH *et al.*, 2005).

Le gaz carbonique se trouve dans un état « supercritique », la matière végétale chargée dans l'extracteur puis le CO₂ est introduit sous pression ensuite le fluide et les composés dissous sont transportés aux séparateurs, où la puissance supercritique du fluide est diminuée en diminuant la pression ou augmentant la température le CO₂ reprend sa forme gazeuse et régénère. Le produit est alors rassemblé par l'intermédiaire d'une valve localisée dans la partie plus inférieure des séparateurs. L'extrait d'origine contenant aucune trace résiduelle de solvant **Fig.3 (WANG et WELLER, 2006).**

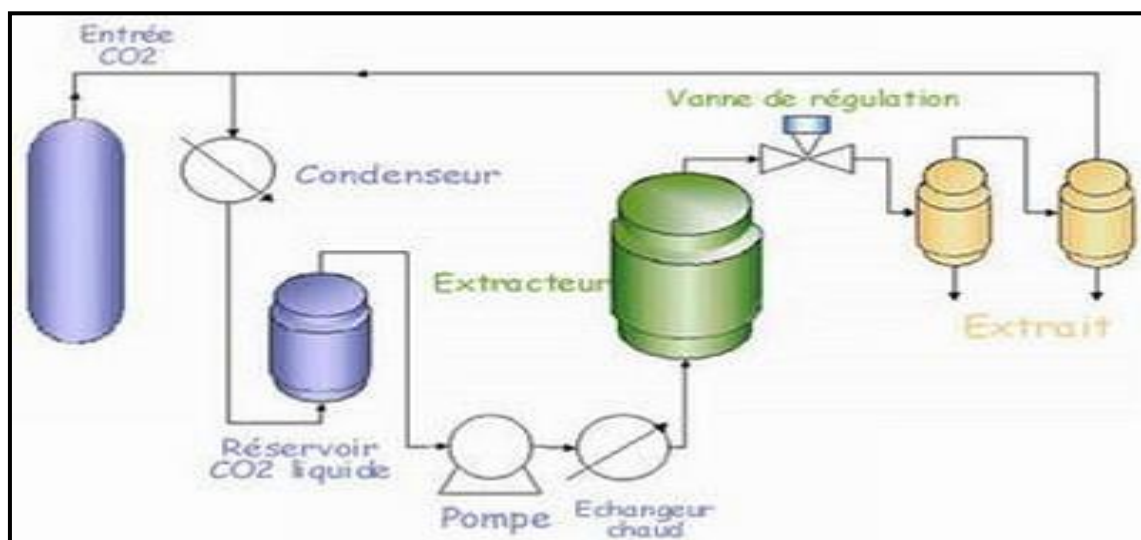


Figure 3 : Schéma du système d'extraction des HEs par un fluide supercritique (BEN AMOR, 2008)

I.6.8. Extraction par micro-onde

L'origine ancestrale de cette technique est la distillation qui a été utilisée autrefois par les chimistes arabes et qui consiste à extraire les huiles essentielles des plantes fragiles à l'aide d'un alambic par l'effet faiblement productif car plusieurs jours sont nécessaires pour extraire les précieuses gouttelettes d'essences de rose.

L'avènement de chauffage micro- ondes en chimie verte permis d'apporter une réponse de choix au problème de la lenteur d'un chauffage solaire dans le domaine de l'extraction d'huile essentielle d'origine végétale (**LUCCHESI, 2005**).

Diverses techniques ont été développées pour l'extraction des produits naturels des plantes afin de raccourcir le temps, diminuer la consommation de solvant, augmenter le rendement d'extraction et la qualité des extraits (**BENDAHOU et al. ; 2008**).

I.7. Composition chimique

Comme toute substance, les huiles essentielles se caractérisent par une composition chimique analysable et très variable. Le nombre de composants isolés est d'environ des milliers et il en reste beaucoup à découvrir (**BACIS, 1999**).

Ces constituants appartiennent, de façon quasi exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpénoïdes (les composés terpéniques) (**Fig.4b**) et le groupe des composés aromatiques dérivés du phenylpropane (**Fig.4a**), beaucoup moins fréquents. Elles peuvent également renfermer divers produits issus du processus de dégradation mettant en jeu des constituants non volatils (**BRUNETON, 1999**).

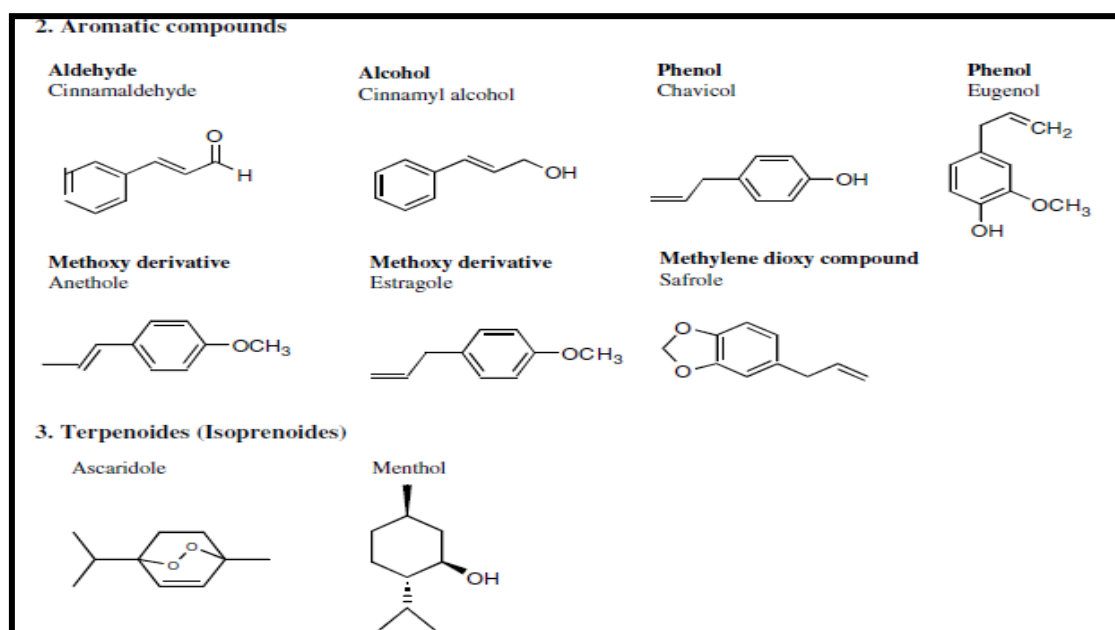


Figure 4 a: Structure chimique de quelques composés des huiles essentielles (**BAKKALI et al ;2008**)

I.7.1. Les composés terpéniques

Les terpènes constituent une famille de composés largement répandus dans le règne végétal. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'une unité isoprénique à 5 atomes C_5H_8 de carbone reconnue par **WALLACH, 1887 in LAMARTI et al ; 1994**. Cet isoprène est à la base du concept de la «règle isoprénique» énoncée en 1953 par **RUZICKA in LAMARTI et al . ; 1994**.

Cette règle considère le diphosphate d'isopentényle (IPP), désigné sous le nom d'isoprène actif comme le véritable précurseur de la molécule terpénique. Les systèmes enzymatiques responsables de cette conversion (IPP en composés terpéniques dans les trois compartiments : cytoplasmes, mitochondries et plastes) sont hydrosolubles ou membranaires.

Ces derniers permettent l'élongation de la chaîne isoprénique conduisant à tout l'éventail des composés terpéniques à 10, 15, 20 et 30 atomes de carbones (**LAMARTI et al . ; 1994**). Seuls les terpènes dont la masse moléculaire est relativement faible (mono et sesquiterpènes) sont rencontrés dans les huiles essentielles (**BRUNETON, 1999**) et leur confère un caractère volatil et est à la base de leurs propriétés olfactives (**PIBIRI, 2006**). Il convient de souligner que la synthèse des terpènes n'est pas propre aux végétaux. Le squalène, ainsi que son nom l'indique est un terpène abondant chez les requins. Des sesquiterpènes et des di terpènes se rencontrent également chez les spongiaires et les coelentérés (**GUIGNARD, 2000**).

Les terpènes sont constitués d'un mélange d'hydrocarbures et de composés oxygénés dérivés de ces hydrocarbures. Dans certaines huiles essentielles, les hydrocarbures prédominent (Ex. l'essence de Térébenthine) dans d'autres, la majeure partie de l'essence est constituée de composés oxygénés. Il est à noter que l'odeur et le goût des huiles essentielles sont donnés par ces composés oxygénés. Parmi ces composés oxygénés, on note d'alcools (géraniol, linalol), d'esters (acétate de linalyle), d'aldéhydes (menthone, camphre, thuyone), les cétones, les éthers, les phénols et les peroxydes (**PARIS et HURABIELLE, 1981 ; SVOBODA et HAMPSON, 1999**).

I.7.2. Monoterpènes

Les composés monoterpéniques sont constitués de deux unités d'isoprène, leur formule chimique brute est $C_{10}H_{16}$ (RAHAL, 2004). Ces composés peuvent être : monoterpènes acycliques (myrcène, ocimènes), monoterpènes monocycliques (α - et γ -terpinène, p-cymène) et aux monoterpènes bicycliques (pinènes, Δ^3 -carène, camphène, sabinène). Selon (BRUNETON, 1999), la réactivité des cations intermédiaires justifie l'existence de nombreuses molécules caractérisées par différentes fonctions : alcools, cétones, esters, aldéhydes, éthers, peroxydes, phénols.

I.7.3. Sesquiterpènes

Ils comportent trois unités d'isoprène, leur formule est $C_{15}H_{24}$ soit une fois et demie (sesqui) la molécule des terpènes (BELAICHE, 1979). Ils présentent une grande variété dans les structures conduisant à un nombre élevé de possibilités, ce qui a retardé l'élucidation de leurs structures (RAHAL, 2004).

Les sesquiterpènes peuvent être également, comme les monoterpènes, acycliques (farnésol), monocycliques (humulène, α -zingibèrene) ou polycycliques (matricine, artéannuine, β , artémisinine). Ils renferment aussi des fonctions comme alcools (farnésol, carotol, β -santalol, patchoulol), cétones (nootkatone, cis-longipinane-2.7-dione, β -vétivone), aldéhydes (sinensals), esters (acétate de cédryle) (BRUNETON, 1999 ; LAOUER, 2004).

I.7.3 Les composés aromatiques dérivés du phénylpropane

Les huiles essentielles renferment aussi des composés aromatiques dérivés du phénylpropane (C_6-C_3), mais qui sont beaucoup moins fréquents que les terpènes et dont la biogenèse est totalement différente (PARIS et HURABIELLE, 1981).

BRUNETON (1999) considère que ces composés sont très souvent des allyl- et propenyl phénols, parfois des aldéhydes, caractéristiques de certaines huiles essentielles d'Apiacées (Anis, Fenouil : anéthole, anisaldehyde, méthylchavicol=estragole. Persil : apiol) mais aussi de celles du Girofle (eugénol), de la Muscade (safrol, eugénol), de l'Estragon (eugénol), du Basilic (eugénol), de l'Accord (asarones) ou des Cannelles (cinnamaldéhyde eugénol safrol). On peut

également selon le même auteur, rencontrer dans les huiles essentielles des composés en C₆-C₁ comme la vanilline (assez fréquente) ou comme l'antranilate de méthyle.

Les lactones dérivées des cinnamiques (par exemple les coumarines) étant, au moins pour les plus simples d'entre elles, entraînaient par la vapeur d'eau, elles seront également présentes dans certaines huiles essentielles.

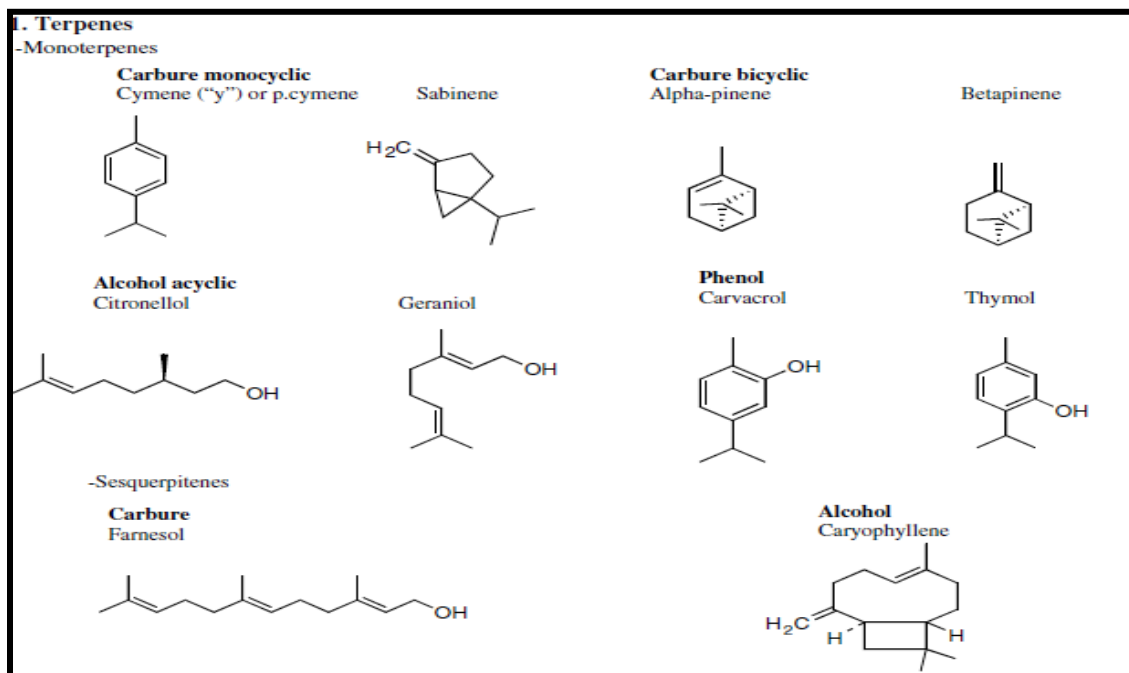


Figure 4b: Structure chimique de quelques composés des huiles essentielles (BAKKALI et al ;.2008)

I.8.Méthodes d'analyse des huiles essentielles

L'instrumentation moderne est progressivement confrontée à des analyses de plus en plus complexes, liées au nombre important de constituant présents et aux quantités extrêmement faibles à détecter. En effet l'analyse d'une huile est complexe, de par son très grand nombre de constituants chimiques volatils mais aussi, souvent, de par l'importance des composés à l'état de traces qui font le caractère spécifique de l'huile (FRANCE-IDA, 1998).

La chromatographie est le procédé fréquemment utilisé pour séparer les constituants des huiles essentielles. Elle se base sur les différences d'affinités des

substances à analyser à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile. Selon la technique chromatographique mise en jeu, la séparation des composants entraînés par la phase mobile, résulte soit de leurs adsorptions et de leurs désorptions successives sur la phase stationnaire, soit de leurs solubilités différentes dans chaque phase (**SCHWEDT, 1993**).

I.8.1.Chromatographie sur couche mince(CCM)

La CCM (Fig. 5) est utilisée comme technique de routine, pour l'analyse rapide de fractions obtenues à la suite d'une séparation initiale. L'efficacité de la CCM comme technique de séparation est souvent mise à profit dans la phase ultime de purification, au moins sur de faibles quantités, lorsque les autres techniques ont montré leurs limites (**PRADEAU et DAUPHIN, 2007**).

La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption, la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. Après que l'échantillon été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant (**CAUDE et JARDY, 1996**). Après la migration, le repérage des molécules s'effectue soit par ultra-violet (UV), soit par un colorant spécifique ou encore par exposition aux vapeurs d'iode.

La distance de migration des composés est ensuite mesurée et comparée à celle du front de la phase mobile, ceci permet de définir la référence frontale(R_f) caractéristique de chaque composé. (**BRUNETON, 1999**). Précise que la technique du CCM, bien que beaucoup moins performante que la chromatographie en phase gazeuse, peut être utilisée en routine pour le contrôle de qualité des huiles essentielles..

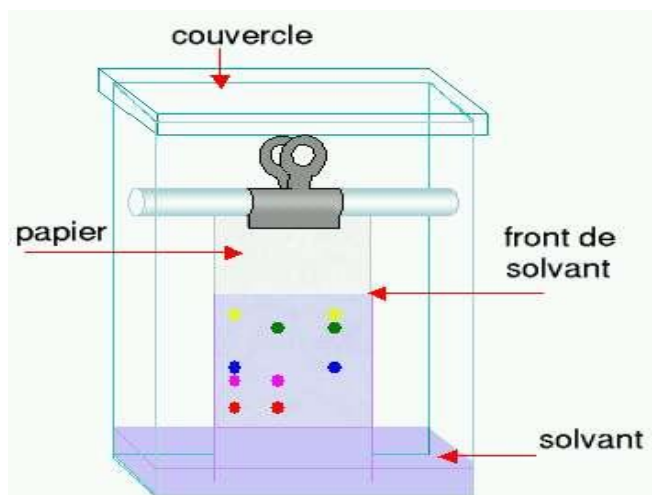


Figure. 5 : Chambre de développement à cuve verticale et plaque de CCM (ROUESSAC, 2004)

I.8.2 .Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GPC/SM)

Si la chromatographie permet à elle seule de séparer correctement les différents constituants d'un mélange, il est néanmoins délicat de se livrer à une interprétation structurale permettant une identification certaine, car les paramètres déduits de la rétention sélective des solutés au travers de la colonne sont souvent lourds à manier et, dans la plupart des cas, peu reliés aux édifices moléculaires organiques. L'idée de coupler une autre méthode physique d'investigation après séparation chromatographique, dans le but d'ajouter à la chromatographie une deuxième dimension analytique, s'est concrétisée dès 1960 dans la combinaison entre la chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse CPG-SM (DE MAACK et SABLIER, 1994).

Le principe de cette méthode consiste à transférer par le gaz vecteur (phase mobile) les composés séparés par chromatographie en phase gazeuse dans le spectromètre de masse au niveau duquel, ils vont être fragmentés en ions de masse variables dont la séparation sera en fonction de leur masse. La comparaison informatique du spectre d'un pic inconnu avec une ou plusieurs bibliothèques de référence permet son identification à condition que la similitude des spectres, inconnus et référence, soit suffisante et que les indices de rétention soient

identiques, dans des conditions opératoires comparables (**DESJOBERT *et al.* ;1997 ;BRUNETON, 1999**)

I.8 .3. Chromatographie liquide à haute performance(HPLC)

Cette technique utilise une phase stationnaire très fine. Les particules solides ont un diamètre pouvant atteindre jusqu'à 5 µm. Le garnissage est tassé dans une colonne fermée. La phase mobile liquide circule sous l'effet d'une haute pression. L'injection de l'échantillon à analyser est pratiquée en introduisant un faible volume de produit (quelques microlitres) dans l'éluant sous pression. Après leur séparation, les différents constituants de l'échantillon sont détectés en sortie de colonne.

Un ordinateur assure l'acquisition et le traitement des données (**AUDIGIE *et al.* ;1995 inBENCHEIKH, 2005**). Cette technique est peu intéressante pour les fractions volatiles, toutefois elle est efficace pour étudier les constituants non volatils des concrètes et des absolues ou pour opérer des préfractionnements, on peut la coupler également à un analyseur de masse (**BRUNETON, 1999**).

I.8.4. Résonance Magnétique Nucléaire RMN

La résonance magnétique nucléaire à haute résolution est un outil exceptionnel pour déterminer la structure d'une molécule naturelle ou synthétique. Grâce à la diversité des paramètres mesurables, elle permet d'aborder l'ensemble des problèmes posés par l'examen d'une molécule en solution.

L'originalité de la RMN par rapport aux autres techniques spectroscopiques réside dans le fait d'apporter une information précise et individuelle sur la très grande majorité des atomes constitutifs de la molécule, de fournir la possibilité d'identifier les connexions entre atomes des diverses entités, squelette, groupes fonctionnels et finalement de permettre de les situer dans l'espace les uns par rapport aux autres. La stratégie présentée pour la détermination de structure par RMN est très efficace pour les molécules de dimension moyenne. Les méthodes de base de la RMN monodimensionnelle et bidimensionnelle sont le plus souvent suffisantes pour atteindre l'objectif fixé (**PLATZER, 2002**).

I.9. Propriétés des HEs

I.9.1 Propriétés antibactériennes

La résistance des microorganismes contre les agents antimicrobiens est devenue de plus en plus un problème majeur et urgent dans le monde (**TIM CUSHNIE et al. 2005**), ce qui a orienté les recherches des agences et des autorités de la santé vers les ressources phytogénétiques pour trouver une solution à ce problème (**SUDANO ROCCARO, 2004**). Selon **GHAsemi PIRBALOUTI et al.(2010)** l'utilisation des HE comme agents antibactériens semble être une solution alternative intéressante pour contrôler la présence des bactéries pathogènes dans les aliments, dont beaucoup de ces huiles ont des activités antibactériennes remarquables contre un large spectre..

Les HEs qui ont des activités antibactériennes déstabilisent la bicouche phospholipidique de la membrane bactérienne, bien qu'elles interviennent dans les systèmes enzymatiques et matériel génétique des bactéries (**KIM et al . ; 1995**). En outre, un certain nombre de constituants des huiles essentielles présentent des propriétés antibactériennes significatives lorsqu'ils sont testés séparément en intervenant par différents mécanismes (**ULTEE et al . ; 1998**).

Il est évident que les Propriétés antibactériennes des huiles essentielles sont plus fortement expliquées par l'effet additif de leurs principaux composés antimicrobiens en raison de leurs constituants mineurs qui apparaissent, à jouer un rôle significatif en synergie (**LATTAOUI et al . ;1994**).

Certains constituants d'HE tels que le carvacrol, le thymol et l'eugénol (composé phénolique) ont été prouvés antibactériens. Les composés Aldéhydes des huiles essentielles sont quelque peu antibactériens ; les constituants aldéhydes : néral, géraniol, citronnellal et cuminal sont les plus largement utilisés. L'action antibactérienne des éthers est certaine, mais irrégulière ; les terpènes ont été prouvés intéressants, mais sont surtout diffusés dans l'air (**KIM et al . ;1995**).

I.9.2. Propriétés antivirales

Les huiles essentielles des différentes familles botaniques présentent des actions antivirales, mais le degré d'efficacité varie selon la souche et la structure virale. C'est en raison de structures moléculaires particulières trouvés dans chaque type viral, que les

huiles essentielles pénètrent dans les entités à des degrés divers (**DAVIDSON et al. ;2005**). Les recherches ont découvert qu'un certain nombre d'huiles essentielles ont une activité antivirale contre certaines souches virales de la grippe, les adénovirus, les souches de la fièvre glandulaire, de l'entérite virale, de l'entérocolite virale et le VIH-1 (**SCHNITZLERetal. ; 2001**).

Des chercheurs ont montré que certains composés spécifiques des huiles essentielles, testés séparément, possèdent une activité antivirale remarquable. Il s'agit de l'acétate d'anéthole, carvone, bêta-caryophyllène, citral, eugénol, limonène, linalol et linalyle(**BELAICHE, 1979**).Les virus sont très sensibles aux molécules aromatiques et certaines infections virales graves peuvent montrer une grande amélioration par la phytothérapie (**HAYASHI etal., 1994**). La synergie entre les composés d'huile tels que cinéole-monoterpénol a été utilisée pour traiter des infections virales des voies respiratoires ;cétones et composés cryptones des huiles essentielles ont montré une capacité de lutte contre les virus nus (**BHASKARA- REDDYet al. ;1998**).Plusieurs méthodes d'action antivirales ont été proposées pour les huiles essentielles bien que pour leurs composés.

Certaines huiles interfèrent avec la glycoprotéine de surface dans l'enveloppe virale, empêchant ainsi l'attachement du virus avec la cellule hôte. On croit que les autres huiles attaquent le virus dans la cellule hôte, possiblement au niveau de la membrane cellulaire (**BELAICHE, 1979**).

I.9.3.Propriétés antifongiques

Les infections fongiques ont augmenté durant ces dernières années en raison du nombre croissant de patients à haut risque, particulièrement les hôtes immunodéprimés (personne avec système immunitaire déficient).L'augmentation de la résistance fongique vis-à-vis les médicaments classiques, les frais de traitement et le fait que les antifongiques les plus disponibles n'ont que l'activité fongistatique, justifient la recherche de nouvelles stratégies (**RAPP, 2004**).

Les huiles essentielles de nombreuses plantes sont reconnues qu'elles possèdent une activité antifongique (**KALEMBA et al.. ;2003**),Cependant, seulement des informations limitées existent sur l'activité vers les champignons pathogènes humains (**OKOH, 2010**).

I.9.4.Propriétés insecticides

La conservation des denrées entreposées est généralement assurée par des insecticides synthétiques qui peuvent être le moyen le plus efficace et le moins coûteux pour contrôler les insectes. Cependant l'utilisation abusive des insecticides chimiques a des effets nocifs (**GUARRERA, 1999**), ce qui oriente les travaux actuels vers la recherche des substances extraites des végétaux qui présentent une activité insecticide, répulsive ou anti-appétant à l'égard des insectes (**BARKIRE, 1996**).

En effet les plantes constituent une source de substances naturelles qui présente un grand potentiel d'application contre les insectes et d'autres parasites des plantes et du monde animal (**BOUZOUITA et al ;. 2008**).

I.9.5. Propriétés Antioxydantes

Le pouvoir de ces huiles est développé comme substitut dans la conservation alimentaire. Ce sont les phénols et polyphénols qui sont responsables de ce pouvoir (**RACHARD, 1992**). Lorsque l'on parle d'activité antioxydant, on distingue deux sortes selon le niveau de leur action : une activité primaire et une activité préventive (indirecte). Les composés qui ont une activité primaire sont interrompus dans la chaîne autocatalytique de l'oxydation (**MULTON, 2002**).

En revanche, les composés qui ont une activité préventive sont capables de retarder l'oxydation par des mécanismes indirects tels que la complexation des ions métalliques ou la réduction d'oxygène etc (**MADHAVI et al . ;1996**).

I.10. Toxicité des huiles essentielles

Les huiles essentielles ne sont pas des produits qui peuvent être utilisés sans risque, comme tous les produits naturels : « ce n'est parce que c'est naturel que c'est sans danger pour l'organisme ». Cet aspect des huiles essentielles est d'autant plus important que leur utilisation, de plus en plus populaire, tend à se généraliser avec l'émergence de nouvelles pratiques thérapeutiques telles que l'aromathérapie. Certaines huiles essentielles sont dangereuses lorsqu'elles sont appliquées sur la peau en raison de leur pouvoir irritant (huiles riches en thymol ou en carvacrol), allergène (huiles riches en cinnamaldéhyde) (**SMITH et al ;.2000**). Les cétones comme l' α -thujone sont particulièrement toxiques pour le tissu nerveux

(**FRACHOMME et al . ;1990**).

I.11. Domaines d'utilisation des huiles essentielles

I.11.1 Aromathérapie

Les HEs sont largement utilisés pour traiter certaines maladies internes et externes. La synergie des différents constituants des HEs détermine leur effet équilibrant. C'est ainsi que certaines HEs peuvent avoir des actions paradoxales, comme, par exemple l'HE de la lavande qui peut avoir un effet à la fois relaxant et stimulant (**WERNER, 2002**). Dans les préparations pharmaceutiques, les HEs riches en composé phénolique (girofle, origan, sarriette, thymaou en aldéhyde cinnamique (écorce de cannelle)). Sont dilués avec de l'huile végétale ou l'alcool pour diminuer leurs agressivités (**PENOËL, 1991**).

I.11.2. Agro-alimentaire

Dans le domaine agro-alimentaire, les huiles essentielles ou leurs composés actifs sont également employés comme agents de conservation tout en assurant une qualité organoleptique meilleure.

Ces HEs peuvent empêcher le développement des champignons phytopathogènes (**ZAMBONELLI et al. ; 2004**), et les microorganismes envahissant les denrées alimentaires. (**MANGENA et MUYINA, 1999**).

I.11.3. Biopesticides

Les biopesticides à base des huiles essentielles présentent une bonne solution pour le problème de résistance chez les ravageurs tout en protégeant l'environnement des pesticides de synthèse. Les modes d'application sont très variés : fumigation, attractif ajouté aux pièges à phéromones, répulsif ou par contact. Plusieurs études ont montré l'effet toxique de certains monoterpènes, exemple l'effet du linéole, du thymol et caracola sur la fécondité et nombre d'œufs pondus du haricot (**REGNAULT –ROGER et HAMRAOUI, 1995**).

Chapitre II

Chapitre II : Les plantes aromatiques et médicinales (PAM)

II. Etude de la Sauge (*Salvia officinalis* L)

II.1 .Famille des Lamiacées

La famille des Lamiacées (labiées) comprend près de 200 genres et 4000 espèces, dont la plupart ont une importance économique due à leur production d'huiles essentielles.

Des études biologiques d'huiles essentielles des espèces *Salvia spp* ont montré des activités

Antimicrobiennes, anti-inflammatoires, en plus de leurs utilisations en cosmétique et agroalimentaire.

Un très grand nombre de genres de la famille des Lamiaceae sont des sources riches en terpénoïdes, flavonoïdes et iridiodes glycosylés (**TEPE et al. ; 2006**) in **ZEROUKI ,2017**.

Le genre *Salvia* (sauge) contient près de 900 espèces majoritairement riches en diterpénoïdes

(**HOHMANN et al. ; 2003** et . **KAMATOU et al. ; 2005** et **RABBANIET , 2005**)

II.2. Le genre *Salvia*

D'après la 1^{ère} histoire, une variété de sauge appelait « Chia » était cultivée par les mexicains. Les grecs, les romains et les arabes ont utilisé la sauge comme tonique, et en compresse contre les morsures de serpent. Au 18^{ème} siècle, les feuilles de la sauge ont été roulées comme des cigarettes pour les fumer contre l'asthme et surtout au printemps (**ANONYME 3**).

II.3.Description morphologique

D'après **TEUSCHER et al. ,(2005)** ,la sauge est un sous- arbrisseau buissonnant et persistant , formant une touffe ligneuse pouvant atteindre jusqu'à 80 cm de haut et dont les tige émettent de nombreux rameaux dressés ,quadrangulaires et laineux , présentant des nœuds saillants sur lesquels sont insérées les feuilles . Celles-ci sont opposées, pétiolées à la base (mais sessiles pour la paire placée au voisinage des fleurs) , oblongues ou lancéolées et ovales , parfois auriculées à la base ; elles sont de couleur vert grisâtre et d'aspect velouté par la présence d'un revêtement laineux visible sur les deux faces , plus abondant au niveau inférieur ; les bords du limbe sont légèrement enroulés et très finement crénelés ; le limbe est épais et chagriné en raison d'un réseau de nervures très marquées , saillantes à la face inférieure .

Les fleurs sont regroupées par 4 à 12 en une inflorescence située à l'extrémité des rameaux et constituant une cyme unipare (simulant un faux verticille lâche) ; elles sont zygomorphes , faiblement pédicelles et d'assez grande taille (3cm) ; leur calice est pubescent , persistant et ponctué de glandes sécrétrices ; en formes de clochette ovale de 10 à 14mm de long , il comprend 5 sépales soudés a la base puis divisés en 2 lèvres, la lèvre inférieure n'est que bidentée ; de 35 mm de long (donc 2 fois plus longue que la calice) , la corolle bilabée comprend 5 pétales soudées , couleur violet clair, parfois rose ou moins blanchâtres ; la lèvre supérieure est forme de casque entier ou marginé ,

formé par la soudure des deux pétales dorsaux ; l'androcée ne comporte que 2 étamines dont la base du connectif qui unit les 2 loges de l'anthere est divisée en deux branches inégales : la plus longue portant la loge fertile est située sous la lèvre supérieure de la corolle , alors que la partie(**TEUSCHER et al . ; 2005**) Fig6.



Figure 6: Photographies de *Salvia officinalis* L.

C'est une plante cultivée un peu partout en Algérie ; sa floraison elle est au mois de Mars- Mai.

II.4.Classification taxonomie

Selon **QUEZEL et SANTA, (1963)** le genre *Salvia* appartient à la classification suivante :

Règne: Plantes
Sous règne: plantes vasculaires
Embranchement: Phanérogames
Sous Embranchement: Angiospermes
Classe: Dicotylédones
Sous classe : Astéridée
Ordre: Lamiales (Labiales)
Famille: Lamiacées
Genre: <i>Salvia</i>
Espèce : <i>officinalis</i> L.

II.5.Répartition géographique

Cette plante vivace est originaire des régions méditerranéennes orientales. Elle préfère les terrains chauds et calcaires. Elle croit de manière spontanée et en culture de long de tout le bassin méditerranéen, depuis l'Espagne jusqu'à la Turquie, et dans le nord de l'Afrique. Cette plante est assez commune en Algérie (**BABA, 2000**).

II.6. Propriétés de la sauge et ces utilisations traditionnelles

La sauge est utilisée depuis l'antiquité, elle possède des propriétés : stimulant, tonique, digestive, fébrifuge et vulnérable. C'est donc un remède à un haut degré. La tisane de sauge est efficace pour faciliter la digestion, relever les forces de l'estomac et de l'intestin, calmer les vomissements spasmodiques, elle active les fonctions circulatoires et cutanées. On l'emploie avantageusement contre la diarrhée, les ballonnements, la transpiration nocturne. On l'a préparée en infusion à la dose de 10g par litre d'eau, laisser infuser 10 mn; prendre une tasse après chaque repas. La sauge se montre également fortifiante, réparatrice des troubles circulatoires.

Les feuilles fraîches ou la poudre des feuilles séchées en friction, préserve les dents de la carie. En bain de bouche et gargarisme l'infusion vineuse fait périr le champignon du muguet, fait disparaître les aphtes, les engorgements ulcéreux et scorbutiques des gencives. Les feuilles sont utilisées couramment en guise de thé. **(BELOUED, 2007).**

II.7. Composition chimique

II.7.1. Huiles essentielles

La sauge contient 5% de tanin, un principe amer, 5,60% de Résine, 6% de gommes, du mucilage, des acides phosphoriques, oxalique, des nitrates, 9% de pentosane, des traces d'asparagine et 1,5 à 2,5% d'huile essentielles dite huile de sauge, renfermant de la thuyone, du bornéol, du cinéol, du camphre, des terpènes et picrosalvine. **(BELOUED, 2007).**

L'analyse des extraits de *Salvia officinalis* a montré que cette espèce contient environ 1.0 à 2.8% d'huile essentielle **(RADULESCU et al. ; 2004 et KENNEDY et SCHOLEY, 2005)**. Les principaux constituants identifiés dans cette huile, par la GC-MS, sont illustrés dans le tableau 1:

Tableau 1 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Salvia officinalis* L. (MILADINOVIC, 2000)

Constituant	Quantité (%)	Constituant	Quantité (%)
-thuyène	0,10	-thuyone	24,88
α -pinène	3,5	β -thuyone	8,08
camphène	3,14	camphre	16,03
2- β -pinène	0,58	1-bornéole	4,31
β -myrcène	0,59	1,4-terpeniolo	0,81
α -terpinène	0,89	Acétate	2,68
1,8-cinéole	9,79	d'endobornyl	0,82
γ -terpinène	0,15	Caryophyllène	3,9
veridiflorol	7,87	β -selinène	3,22
		manool	

II.7.3. Composés phénoliques

La plante contient de l'huile essentielle (les cétones monoterpénique sont considérées comme des constituants principaux), des tanins catéchiques, des acides polyphénols carboxyliques (rosmarinique, caféique, chlorogénique, *p*-coumarique et férulique), des principes amers diterpéniques, des triterpènes pentacycliques (acides ursolique, cratégolique, oléanolique etc.), des phytostérols et des flavones (SAID *et al.* ; 2002).

Tableau 2 : Principales classes de composés phénoliques identifiées dans les feuilles de *Salvia officinalis* L. (MILADINOVIC, 2000)

Classe	Composé
Acides Phénoliques	Acide gallique, Acide 3-O-caféoylquinique, Acide 5-O-caféoylquinique, Acide de caféique, Acide rosmarinique, Acide salvianolique et dérivée, Melitrane A méthyl saugecoumarine, Acide augerinique, Tanshinone II A, Acide lithospermique, Acide yunnaniques, Acide A melitrique, Acide royleanonique et Acide oléanolique.
Diterpènes Phénoliques	Acide carnosolique, Rosmadials, Carnosote de méthyl, Carnosol, Epirosmanol, Epiisorosmanol méthyl ether et Epiisorosmanol ethyl ether
Lavonoides et dérivés	Hesperidine, Apigénine, Hispiduline, Cirsimaritine, Genkwanine, Lutéoline et Lutéoline 7-glucoside.
Tannins	Catéchine et Salvia tannins.

Chapitre III

III : Les maladies infectieuses

III.1. Généralité sur les maladies infectieuses

III.1.1. Les maladies infectieuses

Tableau 3 : Quelques membres représentatifs de la flore normale dans diverses parties du Corps humain (**TORTORA et al. 2003**)

Parties du corps	Principaux microorganismes
Yeux (Conjonctive)	<i>Propionibacterium acnes</i> , <i>Staphylococcus epidermis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Corynebacterium xerosis</i> , <i>Pityrosporum spp.</i> <i>Candida sp.</i>
Nez et pharynx (voies Respiratoires supérieures)	<i>Staphylococcus epidermis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , diphtéroïdes.
Jéjunum et iléum	<i>Staphylococcus epidermis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> et des diphtéroïdes anaérobies dans le nez ; <i>Staphylococcus epidermis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Haemophilus</i> et <i>Neisseria</i> , des diphtéroïdes dans la gorge.
Gros intestin	Divers espèces de <i>Staphylococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Actinomyces</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Haemophilus</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Treponema</i> non pathogène et <i>Candida sp.</i>
Gros intestin	<i>Staphylococcus</i> groupe D, <i>Bacteroides</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>obacter</i> , <i>Proteus</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Shigella</i> et <i>Candida sp.</i>
Système urogénital	<i>Staphylococcus epidermis</i> , micrococci aérobies, <i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , diphtéroïdes aérobies, <i>Pseudomonas</i> , <i>Klebsiella</i> et <i>Proteus</i> dans l'urètre ; lactobacilles, diphtéroïdes aérobies, <i>Streptococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Candida albicans</i> et <i>Trichomonas vaginalis</i> à l'occasion dans le vagin.

III.1.2. La flore microbienne normale Chez l'homme

Elle concerne les microorganismes hébergés par l'homme qui contribuent à sa bonne santé (**MADIGAN ET MARTINKO, 2007**) (**Tableau 3**).

La flore normale après son développement, procure des avantages à son hôte en prévenant la croissance de microorganismes nuisibles. Ce phénomène, appelé antagonisme microbien ou effet de barrière, fait intervenir la compétition entre des microbes (**PERRY et al. ; 2004**). La flore normale protège ainsi l'hôte contre l'implantation de microorganismes potentiellement pathogènes ; elle entre en compétition avec ces derniers pour les nutriments, produit des substances susceptibles de leur nuire et influe sur les

conditions ambiantes; tels que le pH et la quantité de dioxygène disponible (**TORTORA et al . ; 2003**).

III.1.3. Les infections nosocomiales

Le risque de contracter une infection à l'hôpital a toujours existé et ce risque s'est accru avec l'évaluation des pratique de soin et de recrutement des patients, la pratique de soin et de recrutement des patient , la pratique de soins plus efficace mais souvent plus invasif s'est accompagnée d'une possibilité de contamination par les micro-organisme d'origine endogène ou exogène (**ASTRAGNEAU , 1998**) .

Les infection nosocomiales (du grec nosos : maladie , et komein : prend soins de) sont des infection acquises dans le cadre d'une activité médicale qu'elle soit hospitalier ou ambulatoire .Elles regroupent l'ensemble des maladies infectieuses que les patients vont contracter au cours de leur hospitalisation (**BEUCAIRE , 1997 ; PELLAS et al . ;2002**). Par conséquence, les infection nosocomiales hospitalières ont été définies comme des infection acquise dans un délai de 48 heures après l'admission d'un patient ou rapidement après sa sortie (**BEUCAIRE , 1997**).

La transmission de micro-organisme vers le patient peut être directe, en particulier lors de l'inhalation de gouttelettes d'eau contaminée ou indirect, lors qu'elle est vectorisée par les mains du personnel soignant (**PELLAS et al. ; 2002**).

Parmi les germes qui sont responsable des infections nosocomiales

III.2. Généralité sur les microorganismes pathogènes

III.2.1. *Staphylococcus aureus*

III.2.1.1. Généralités

Les espèces de *Staphylococcus aureus* ont été identifiées par Pasteur lui-même : ce sont des bactéries qui provoquent des infections d'une extrême gravité (**LOUP, 1991**).

Elles font partie des bactéries pathogènes les plus résistantes , et sont difficiles à éliminer de l'environnement humain . Certaines souches fabriquent aussi des toxines responsables de différents maladies : intoxications alimentaires, syndrome du choc toxique (TTS), une maladie rencontrée surtout chez les enfants , le syndrome de lyell (**SCHARCHER ,1999**) .

Les *Staphylocoques* sont des cocci à gram – positif qui tendent à se grouper en amas , d'environ 1 µm de diamètre , immobile , dépourvue des spores et des capsules .Le pH de la croissance de cette bactérie se situent entre 4, 5 et 7, 6 (LOUP , 1991). Une espèce *Staphylococcus aureus* (*Staphylocoque doré*) tient une place très importante dans les infections communautaires et nosocomiales (NAUCIEL et VIDÉ , 2005) .

III.2.1.2. Classification

Règne : Bacteria
Division : Firmicutes
Classe : Bacilli
Ordre : Bacillales
La famille : Micrococaceae
Genre : <i>Staphylococcus</i>
Espèce : <i>aureus</i> (PILLET et al , 1986)

III.2.1.3. Habitat

Staphylococcus aureus est un germe ubiquitaire, retrouvé dans le sol , l'air et l'eau

(FRANCHERE et AVRI, 2002). Cette bactérie est très répandue chez l'homme et dans de nombreuses espèces animales . Chez L'homme environ un tiers des sujets porteurs sains , ils hébergent la bactéries au niveau des muqueuses (principalement les fosses nasales) et les zones cutanées humides (périnée , aisselles) (NAUCIEL et VILDÉ , 2005).

III.2.1.4. Caractéristiques morphologiques

Les *Staphylocoques* apparaissent à l'examen microscopique comme des cocci à Gram positif , bactéries sphériques de 0,8 à 1 µm de diamètre , regroupés en diplocoques ou en petits amas (grappes de raisin) . Ils sont immobiles, sporules, habituellement sans capsule.

Ces bactéries sont aéro-anaérobies, à métabolisme respiratoire et fermentaire, sa cultivant facilement en 24 heures sur milieux facultatifs. *Staphylococcus aureus*

peut être aussi isolé sur milieux sélectifs (Chapman) , les colonies sont lisses de 1 à 4 mm de diamètre (**BERCH et al . ; 1989**).

III.2.1.5. Caractéristiques biochimiques

De nombreuses souches de *S. aureus* produisent un pigment jaune doré ou citrine , non diffusible (caroténoïde) , et sont hémolytiques sur gélose au sang . toutes les espèces du genre *Staphylococcus* sont catalase positive. l'espèce *Staphylococcus aureus* est capable de fermenter la mannitol , et de produire des enzymes extracellulaires (Staphylocoagulase , DNAase) , et est possible de mettre en évidence la protéine A de la paroi , chez presque de 90% des souches (**BERCH et al ., 1989**) .

III.2.1.6 .Pouvoir pathogène

Staphylococcus peut causer

✚ Des lésions suppurées : les plus fréquentes sont cutanées et sous – cutanées : folliculite, furoncle , anthrax , impétigo bullbeux , panarie , surinfection des plaies traumatiques ou post –opératoires .

Staphylococcus aureus est aussi responsable de mastites chez les femmes qui allaitent .Des atteintes pulmonaires peuvent s'observer notamment chez la nourrisson et chez les malades sous ventilation assistée (**NAUCILE et VIDÉ ., 2005**) .

✚ Septicémies et endocardites : les lésions suppuratives peuvent se compliquer de septicémie.

une forme particulière est staphylococcie maligne de la face. Elle a pour origine un furoncle de la lèvre ou de la narine qui complique d'une thrombophlébite suppurée. En milieu hospitalier, les septicémies d'origine nosocomiale.

III.2.1.7. Résistance aux antibiotiques

Initialement *Staphylococcus aureus* sensible à de très nombreux antibiotiques .Le traitement de *Staphylococcus aureus* a été révolutionné par l'apparition de la pénicilline, malheureusement les résistances sont très rapidement venues compliquer les choses

(**ROBERT , 1982**) .

Actuellement, la résistance de *Staphylococcus aureus* aux beta – lactamines s'explique par deux mécanismes principaux : la production de pénicillinases et la modification des cibles d'action de ces antibiotiques , la protéines liant les pnicillines (PLP) .

Les Souches de *Staphylococcus aureus* productrices de pénicillinases (environ 70 % à 80% en communauté et 80% à90% en milieu hospitalier) sont résistantes à la pénicilline G , aux aminopénicillines , aux carboxypénicillines et aux uréidopénicillines . En revauche , ses souches conservent une sensibilité aux pénicillines M, aux céphalosporines et aux carbapénèmes (**MACHET et al., 2006**).

III.2.2. *Pseudomonas aeruginosa*

III.2.2.1. Généralités

P. aeruginosa à été isolé en 1882 par Carle Gessard à partir du pus bleu d'infection cutanée post chirurgicale (**MYER, 1995**) .*Pseudomonas aeruginosa* ,bacille pyocyanique était tenu pour responsable d'infection graves uniquement observées en milieu chirurgicale (**BERCHE et SIMMONET , 1989**).

Le bacille pyocyanique ; terme issu du grec puon = pus et Kuanos = bleu (peu bleu) et maintenant connu sous le non de *Pseudomonas aeruginosa*. Le nom est composé du grec pseudo = fau et monas = unité (fausse unité) , aeruginosa , veut dire vert –de – gris (en latin c'est le résultat la corrosion du cuivre) , réfère à un pigment que cette bactérie contient (**VERON et al.. ;1982**).

Il occasionne de nombreuses infection chez les sujets fragilisés . Il est à l'origine de 10 % des infection nosocomial (**REGNAULT ,2000**) .

Le genre *Pseudomonas* est fait de bacilles mobiles (à ciliature polaire , aérobies strictes , se cultivent facilement sur les milieux usuels *P. aeruginosa* se caractérise par la pigmentation bleu – vert de ses colonies (**NAUCIEL et VILDÉ , 2005**).

Pseudomonas aeruginosa est l'espèce la plus fréquemment isolée en bactériologie médicale, parfois commensal du tube digestif les bactéries du genre *Pseudomonas* sont caractérisées par leur résistance au antibiotiques et aux antiseptiques, elles accumulent l'origine de 10 % des infections nosocomiales (**REGNAULT, 2000**).

III.2.2.2. Classification (Pillet et al ., 1986)

Règne : Bacteria
Division : Proteobacteria
Classe : Gammaproteobacteria
Ordre : Pseudomonadales
La famille : Pseudomonadaceae
Genre : <i>Pseudomonas</i>
Espèce : <i>aeruginosa</i>

III.2.2.3. Habitat

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie saprophyte de l'air, de l'eau, et du sol. Elle est commensale des téguments et des muqueuses de l'homme et des animaux. On la trouve aussi dans le tube digestif de l'homme et rarement dans la salive (FAUCHÈRE et AVRIL, 2002).

Cette bactérie possède un pouvoir pathogène étendu, le bacille pyocyanique est essentiellement une bactérie pyogène qui provoque chez l'homme et chez l'animal des suppurations diverses particulièrement fréquentes en milieu hospitalier. Ces infections se développent généralement sur des terrains débilisés (PILLET et al . ; 1986) .

III.2.2.4. Caractéristiques morphologiques

Le genre *Pseudomonas* appartient à la famille de Pseudomonaceae. Il s'agit de bacilles droits ou incurvés, dont la paroi est de type Gram négatif. Ces bactéries sont mobiles par flagellation polaires, ou immobiles. Il s'agit de bactéries dont le métabolisme est respiratoire et jamais fermentaire ; toutefois elles peuvent se développer dans une atmosphère pauvre en oxygène. Leur croissance est possible dans une large gamme de températures (de 4°C à 43°C), avec de nombreuses souches psychrophiles (BERCHE et al . ; 1989).

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie aérobie stricte. Elle croît très facilement sur milieux ordinaires. En 24 heures, sur gélose nutritive, les colonies apparaissent souvent dissociées. Dans 95 % des cas, les colonies de *P. aeruginosa* sont pigmentées en vert du fait de la production de deux pigments : la pyocyanine et pyoverdine (**BERCHE et al. ; 1989**).

III.2.2.5. Caractéristiques biochimiques

Cette bactérie possède une catalase et une oxydase et elle est prototrophe vis-à-vis de nombreuses sources de carbone ; elle n'a pas d'exigences de croissance et est résistante à toutes sortes d'agents antimicrobiens (**BECHER et al. ;1989**). Elle possède aussi une arginine – dihydrolase et 20 à 80% des souches appartenant à cette bactérie possèdent une gélatinase et désoxyribonucléase.

Elle est capable de produire la pyocyanine et la pyoverdine, et elle est sensible à la polymyxine (**BERCHE et al. ;1989**).

III.2.2. 6. Pouvoir pathogène

La bactérie n'est pas pathogène pour le sujet normal, mais elle peut provoquer des infections parfois sévères chez les sujets dont les défenses sont amoindries. Elle peut provoquer des infections urinaires, bronchiques (en particulier chez les sujets atteints de mucoviscidose), pulmonaires, oculaires (kératite ou enophtalmie), ostéo – articulaires. Elle peut aussi infecter des lésions cutanées (brûlures), des plaies traumatiques ou postopératoires, provoquer des otites externes (pouvant évoluer d'une manière invasive chez les sujets âgés et les diabétiques), des septicémies, des endocardites (**NAUCIEL et VILDÉ, 2005**).

III.2.2.6. Résistance aux antibiotiques

Pseudomonas aeruginosa c'est une bactérie généralement multirésistante. Une des caractéristiques les plus inquiétantes du *Pseudomonas aeruginosa* est sa faible sensibilité aux antibiotiques (**CORNELIS, 2008**).

La plupart des *Pseudomonas spp* sont naturellement résistantes à la pénicilline et la majorité des bêta –lactamines liés, mais un certain nombre sont sensibles à la

pipéracilline , imipénème , à la titraciline , la tobramycine , la ciprofloxacine (**RYAN et RAY , 2004**) . Outre une résistance intrinsèque , *Pseudomonas aeruginosa* peut facilement développer une résistance acquise soit pour mutation dans les gènes chromosomiques,ou par le transfert horizontal de gènes déterminants de résistance aux antibiotiques (**CORNELIS , 2008**) .

Partie II
Matériel et méthodes

Partie II : Matériel et Méthodes

II.1. Matériel biologique :

II.1.1. Le matériel végétal :

Le matériel végétal utilisé dans notre expérimentation repose sur deux plantes aromatiques à savoir ***Salvia officinalis* L.** récoltée dans le campus de l'université de Mostaganem ex : ITA (Photo2).



Photo1 : *Salvia officinalis* . L poussant dans le campus (ITA)

II.2. Méthodes

II.2.1. Extraction des Huiles de *Salvia officinalis* L.

L'extraction et l'étude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle des feuilles et tige de la sauge (*salvia officinalis*) sont réalisées au laboratoire pédagogique de la faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et le Laboratoire De l'Hôpital (Ain Tadles).

II.2.2. Dispositif d'extraction :

L'extraction de l'huile essentielle (HE) des feuilles de *salvia officinalis* a été réalisée par un hydrodistillateur de type Clevenger (Photo 3).

Il est constitué d'une chauffe ballon, un ballon en verre pyrex où l'on place le matériel végétal et de l'eau distillée, une colonne de condensation de la vapeur (réfrigérant) et un collecteur en verre pyrex également qui reçoit les extraits de la distillation.

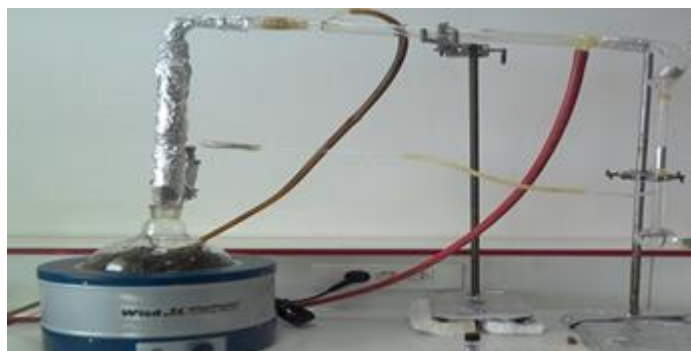


Photo 2 : Appareil d'hydrodistillation (Clevenger)

II.2.3. Procédé d'extraction des HEs

Une quantité de 150g des feuilles sèches *Salvia officinalis* L. est mise dans un ballon en verre pyrex, additionnée de 2000 ml d'eau distillée. L'ensemble est porté à ébullition, après l'apparition de la première goutte de distillat à la sortie du tube de condensation de la vapeur, l'huile essentielle est alors entraînée par la vapeur d'eau.

Elle est ensuite condensée en passant par un condensateur, fixé par un support approprié en position verticale pour faciliter l'écoulement du distillat. Le temps de cette extraction est d'environ deux heures.

Le distillat obtenu est récupéré dans une ampoule à décanter. Le mélange est laissé au repos quelques minutes, ce qui résulte l'apparition de deux phases, l'une est organique (huile essentielle) et l'autre est aqueuse. En fin, le distillat est recueilli dans un tube à essai et l'huile essentielle de feuilles sèches de la sauge sera par la suite récupérée dans un flacon approprié.

II.2.4. Conservation de l'huile essentielle obtenue

La conservation de l'huile essentielle exige certaines précautions indispensables (**BURT,2004**). C'est pour cela nous avons conservé l'huile essentielle des feuilles sèches à une température voisine de 4°C, dans un flacon en verre stérile fermé hermétiquement pour la préserver de l'air et de la lumière (en utilisant le papier d'aluminium) (Photo4).



Photo 3 : Quantité d'Huile essentielle recueillie dans des flacons

II.2.5. Détermination du rendement d'extraction

Le rendement d'extraction de l'huile essentielle est calculé par le poids de la matière végétale séchée avant extraction le rendement exprimé en pourcentage a été calculé par la formule suivante (**CARRE,1953**).

$$R = P_B / P_A * 100$$

P_B: Poids d'huile en g

P_A: Poids de la plante en g

R : Rendement d'huile essentielle en pourcentages

II.3. Confirmation de l'identification des souches :

II.3.1. Coloration de Gram :

C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne. Son avantage est de donner une information rapide sur les bactéries présentes dans un produit ou un milieu tant sur le type que la forme (**MARCHAL et al; 1987**).

Les deux souches utilisées dans notre étude sont des germes responsables des infections intestinales et nosocomiales (Tab.3) ; il s'agit des :

- **Bactéries à Gram -** : *Pseudomonas aeruginosa*
- **Bactéries à Gram +** : *Staphylococcus aureus*



Photo 4 : *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*

Tab. 3 : La source de souches pathogènes testées

Les microorganismes		La source
Bactéries	<i>Staphylococcus aureus</i>	Laboratoire de microbiologie de l'hôpital de Ain tedles
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Laboratoire de microbiologies et biologie végétale

II.3.2. Test de la catalase :

Certaines bactéries produisent du peroxyde d'hydrogène. Celui –ci est très toxique mais beaucoup de bactéries sont capables de le dégrader grâce à une enzyme appelé catalase.

Ce test est réalisé par une mise en contact entre une colonie bactérienne et une goutte d'eau oxygène (H₂O₂) (**CARBONNELLE et al. ; 1987**).

II.3.3. Test de l'oxydase :

Ce test a pour but de déterminer la présence d'un cytochrome oxydase active, on doit utiliser un substrat déterminées : N-diméthyl paraphénylène diamine qui réagira en sa présence par un changement de couleur. On dépose quelques de ce réactif sur une colonie bactérienne, la lecture est effectuée après quelques secondes (**CARBONNELLE *et al.* ; 1987**).

II.3.4. Test de l'Antibiogramme.

L'antibiogramme permet de mesurer la capacité d'un antibiotique à inhiber la croissance bactérienne in vitro (Fig.1).

Nous avons utilisé cette méthode afin de savoir l'effet des antibiotiques contre les bactéries étudiées (**COURVALLIN *et al.* ; 1985**). L'activité antibactérienne des antibiotiques a été évaluée à l'aide **de la méthode par diffusion par disque**, les bactéries ont étéensemencées en surface sur gélose Mueller -Hinton en utilisant un **écouvillon**, les disques d'antibiotiques ont été ensuite déposés en surface du milieuensemencé et incubé à 37 °C pendant 18 heures (**COURVALLIN *et al.* ; 1985**).

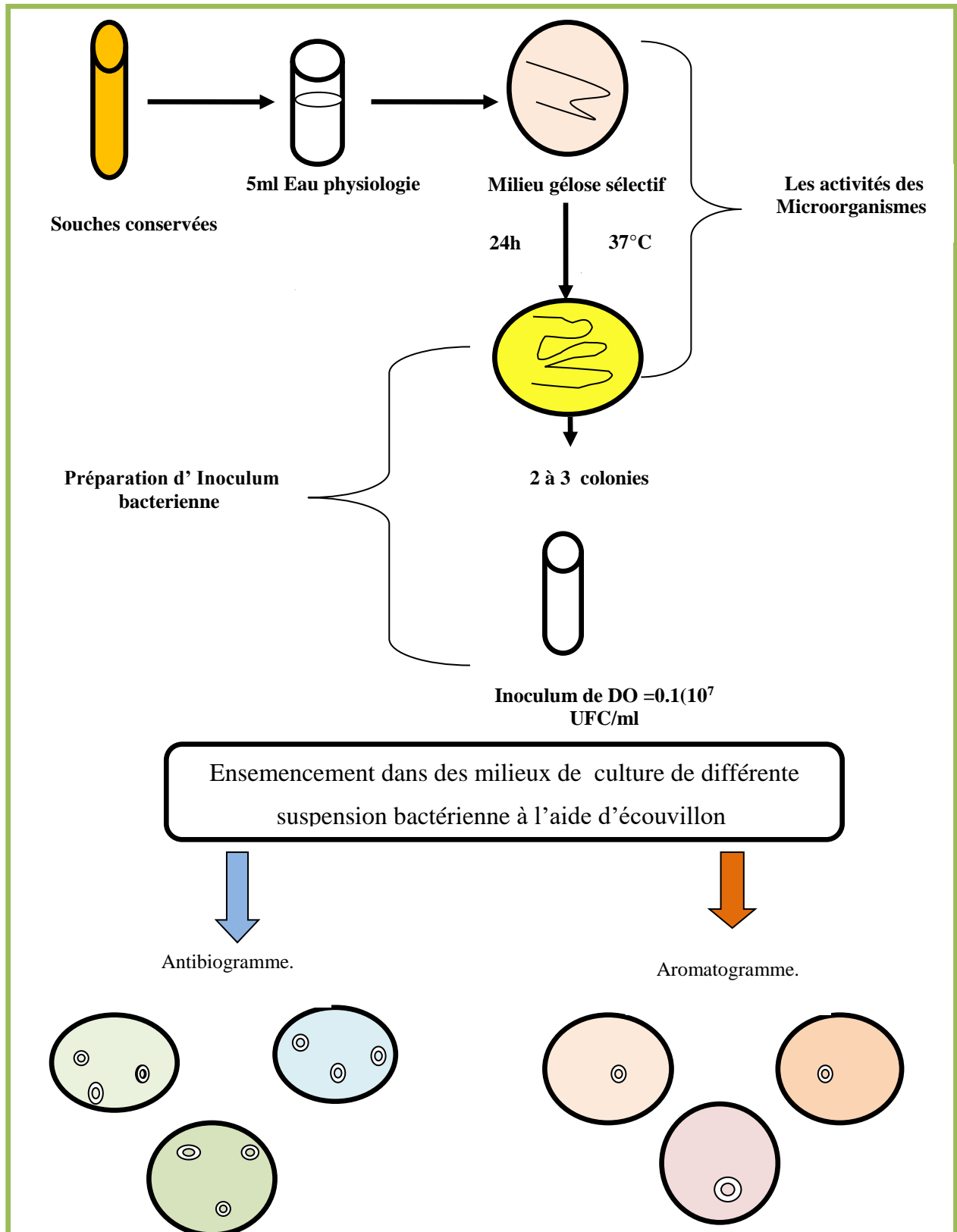


Fig.7. Test de l'Antibiogramme et de l'Aromatogramme

II.3.5.Préparation de la suspension bactérienne.

La préparation de la suspension microbienne est réalisée en introduisant deux colonies pures bien isolées de chaque espèce étudiée, dans 9 ml de l'eau physiologie contenue dans un tube à essai. pour l'ensemencement ultérieurs, on homogénéise la suspension bactérienne par vortex, son opacité doit être équivalente à une DO de 0,08 à 0,10 MCFARLAND à 625 nm à l'aide d'une spectrophotomètre de type SECOMAM 1340UV-vis, la concentration finale obtenue est de 10^8 germes /ml de suspension bactérienne (**BEKHICHI *et al*; 2008**).



Photo 5: la suspension bactérienne

II.3.5.1.Ensemencement.

La gélose de Mueller Hinton a été coulée dans des boîtes de Pétri sur une épaisseur de 4 mm puis laisse solidifier. L'ensemencer les milieux de culture de différentes suspensions bactériennes à l'aide d'écouvillon.

Dans des conditions aseptiques et à l'aide d'une pince stérile, des disques de 6 mm de diamètre de papier Wattman N° (2 disques /boîte) sont imbibés par 10 µl de chaque extrait puis déposés sur le milieu DMSO.

Les boîtes sont maintenues à température 4°C pendant 20 min pour que l'extrait puisse diffuser. Les boîtes ont été incubées à l'étuve à 37°C pendant 24 (Fig.8).

Matériel et méthodes

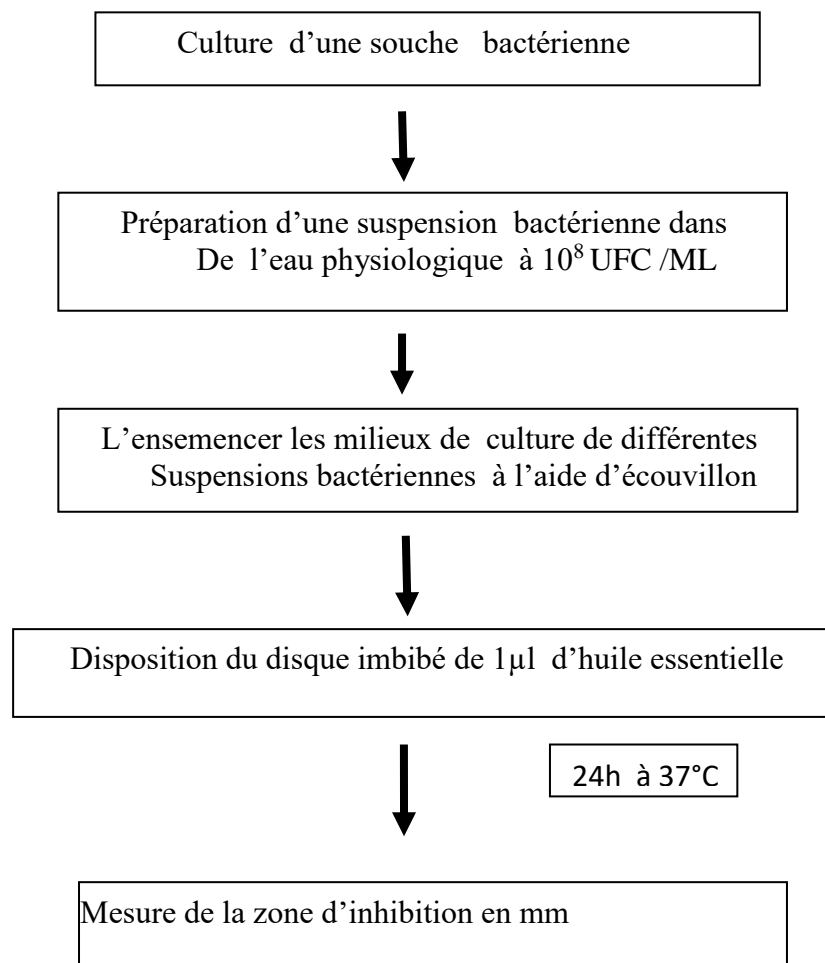


Fig. 8 : Les étapes du protocole de l'activité antibactérienne

Matériel et méthodes

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des huiles essentielles ont été déterminées selon la méthode rapportée par **(REMMAL *et al.* ;1993.)** et **(SATRANI *et al.* ;2001.)**. Du fait de la non miscibilité des huiles essentielles à l'eau et donc au milieu de culture, la mise en émulsion a été réalisée grâce à une solution DMSO afin de favoriser le contact germe/composé. Des dilutions sont préparées au 1/10e, 1/5e, 1/2,5e, 1/e, 1/125e, 1/0.615e et 1/0.312e dans cette solution DMSO Dans des tubes à hémolyse contenant chacun 1350 ul DMSO et on ajoute 150 ul de chacune des dilutions de façon à obtenir les concentrations finales de Puis on agite convenablement les tubes avant de les verser dans des boîtes de Pétri. Des témoins, contenant la solution de DMSO seule, on ajoute 10 ml de milieu Mueller Hinton pour les bactéries et levure stérilisés à l'autoclave (20 min à 121 °C) et refroidis à 45 °C,

L'ensemencement se fait par stries à l'aide d'une anse de platine à partir de suspension bactérienne de concentration 104 UFC / ml (Fig.9).

- Mettre à nouveau les boîtes dans l'étuve à 37 % pendant 24 heures.

- Lecture des résultats:

- La lecture de CMI est faite après 24 heures.

- La lecture de CMI est réalisée uniquement dans les milieux de faible croissance de bactérie.

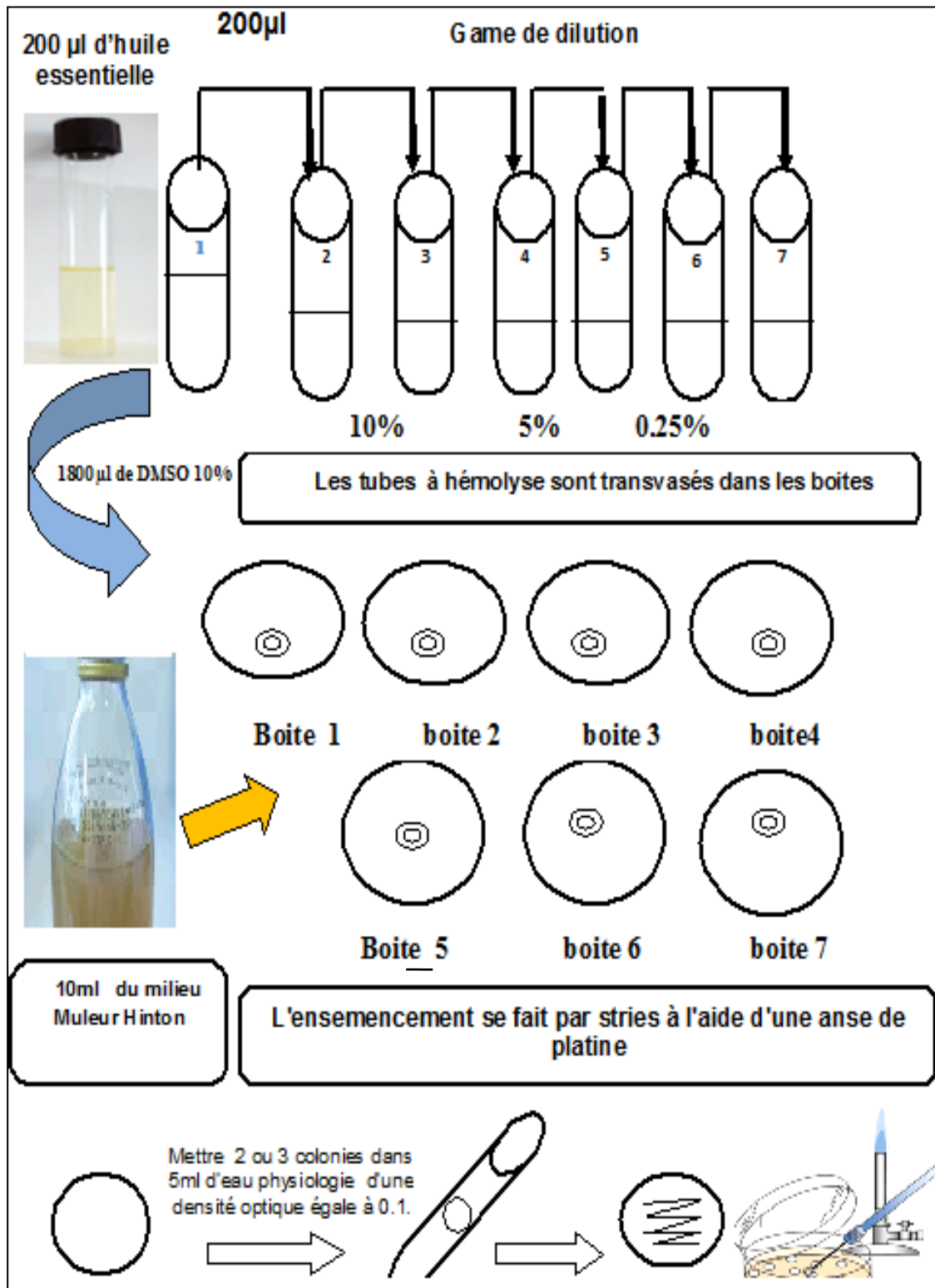


Fig. 9. Ensemencement des bactéries à l'aide d'une anse de platine à partir de suspension à différentes concentrations

Partie III
Résultats

RESULTATS

Partie III. Résultats

III.1. Tests microbiologiques

III.2 .Confirmation de l'identification des souches pathogenes testées

II.2.1. L'étude macroscopique

a) *Pseudomonas aeruginosa*

L'observation macroscopiques a montré que les colonées des *Pseudomonas aeruginosa* ayant une formes plate opaque , bombese, de couleur régulier et parfois irrégulier , avec un aspect une pigmentation jaune verdâtre présente dans le milieu **king B** et bleu vert dans le milieu **king A** (Photo 6) et sur gélose nutritive (Photo 7) .

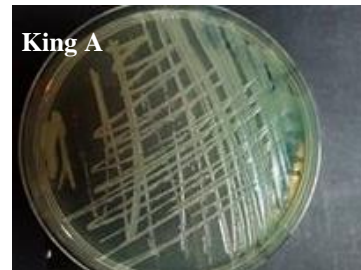


Photo 6 : Aspect macroscopique de *Pseudomonas aeruginosa* ensemencée sur milieu King B et King A



Photo 7 : Aspect macroscopique de *Pseudomonas aeruginosa* ensemence sur gélose nutritive

b) *Staphylococcus aureus* sur milieu Chapman apparait de couleur blanchâtre crémeuse et de bordure réguliers de 2 a3 mm de diamètre avec un virage de couleur vert le jaune – orange (Photo 7) et sur milieu Gélose Nutritif les colonies de *Staphylococcus aureus* apparaissent souvent pigmentées et entourées d'une aréole jaune dans le cas où le mannitol est fermenté (Photo 7,8 et 9)..

RESULTATS

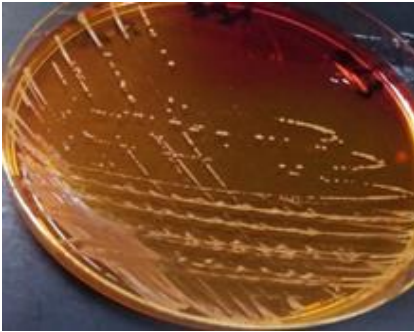


Photo 8: Aspect macroscopique de *Staphylococcus aureus* ensemencé sur milieu de Chapman

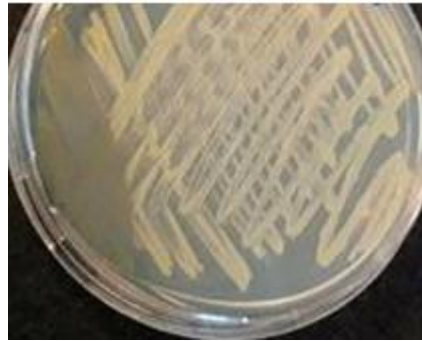


Photo 9 : Aspect macroscopique de *Staphylococcus aureus* ensemencé sur milieu de gélose nutritive

III.2.2. L'étude microscopique

III.2.2.1. La coloration de Gram:

Après la réalisation de coloration de gram pour les germes isolés, nous avons obtenu des cellules colorées en rose c'est les Gram négatif et d'autre colorées en violet Gram positif. Les observations ont été obtenues avec un grossissement de 100X. (voir Photo 10 et 11).

a) *Pseudomonas aeruginosa*

L'observation microscopique des bactéries après la coloration de Gram de frotis réalisée à partir des cultures purifiées a montré que la souche de *Pseudomonas aeruginosa* apparaît sous forme de bacille soit en diplocoque, à couleur rose de Gram négatif (Photo 10).

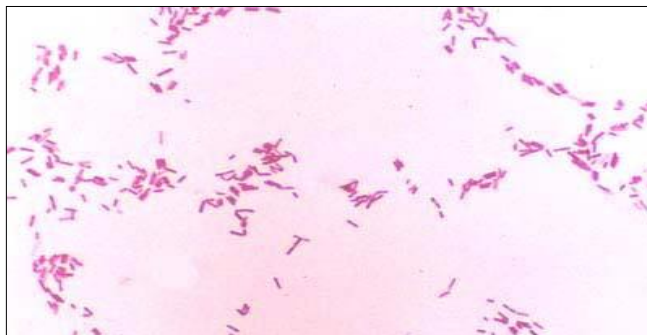


Photo 10: Observation microscopique de *Pseudomonas aeruginosa* après coloration par un grossissement X (1000) (Gram négatif).

RESULTATS

b) *Staphylococcus aureus* .

Ils apparaissent sous forme des des *Cocci* sphériques, arrondis, colorés en violet de Gram positif ,regroupées le plus souvent en amas dit grappe de raisin, Cependant ils peuvent également isolés, par paires ou en très courte chaine (Phot 11).

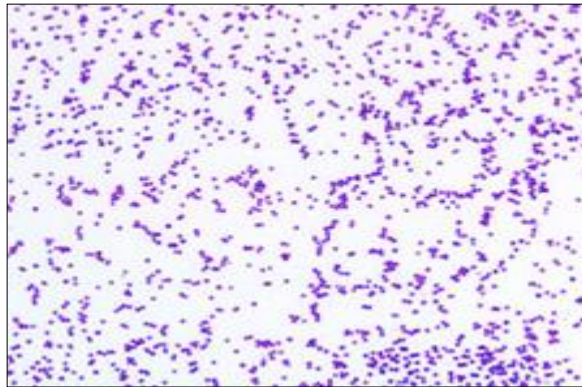


Photo 11 : Observation microscopique de *Staphylococcus aureus* après coloration par un grossissement X(1000). (Gram positif)

III.2.2.2.Test de la Catalase

L'addition d' H_2O_2 sur les colonie de *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* a révélé un dégagement de gaz sous forme de bulle qui indique la presence de la catalase chez les deux isolats (Photo12 et 13).



Photo 12 : Résultat du test catalase positif de *Pseudomonas aeruginosa*

RESULTATS



Photo 13 : Résultat du test catalase positif de *Staphylococcus aureus*

III.2.2.3 .Test de L'oxydase

La coloration violet qui apparue en quelques secondes, révèle une réaction positif (Photo14 et 15)



Photo 14: Résultat du test oxydase positif de *Pseudomonas aeruginosa*



Photo15: Résultat du test oxydase négatif de *Staphylococcus aureus* .

III.3. Test d'antibiogramme

Les resultats d'antibiogrammeobtenus sont résumes dans les tableaux et les Figure N° 3 et 4 Photo (16 et17).

RESULTATS

La sensibilité ainsi que la résistance des bactéries testées aux différents antibiotiques sont représentées dans la Photo (16 et 17).



Photo 16 : Effet des antibiotiques sur la croissance de *Staphylococcus aureus* sur milieu Mueller Hinton.

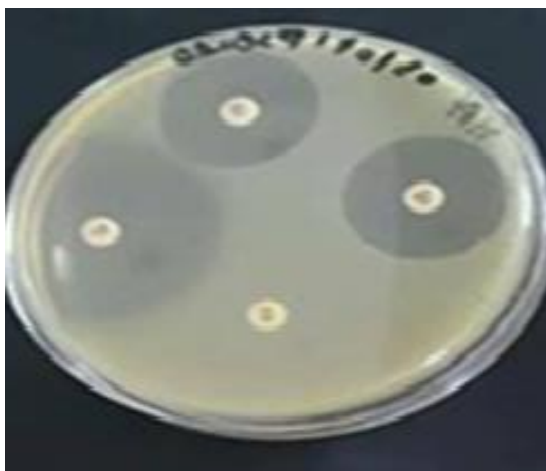


Photo 17 : Effet des antibiotiques sur la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* sur milieu Mueller Hinton.

RESULTATS

III.3.1. L'effet des antibiotiques sur la croissance *Staphylococcus aureus*

Les cinq antibiotiques testés ont provoqué une réaction positive chez *Staphylococcus aureus* où nous avons constaté une forte inhibition avec la Gentamycine (CN) 30,67mm (Tableau 5).

Tab.5. Résultats de l'antibiogramme de *Staphylococcus aureus*.

Antibiotique	Diamètre critique (mm)			Staphylococcus aureus.	
	R	I	S	Ø	Résultat
Gentamycine(CN)	<20		>20	30,67	S
Fospomycine (FF)	<14		>14	26	S
Ciprofloxacine(CIP)	<20		>20	29,33	S
Tobrammycine(TMN)	≤14	13-16	≥17	29	S
Vancomycine(VA)	RN		>17	21,67	S

S : Sensible, R : Résistant.

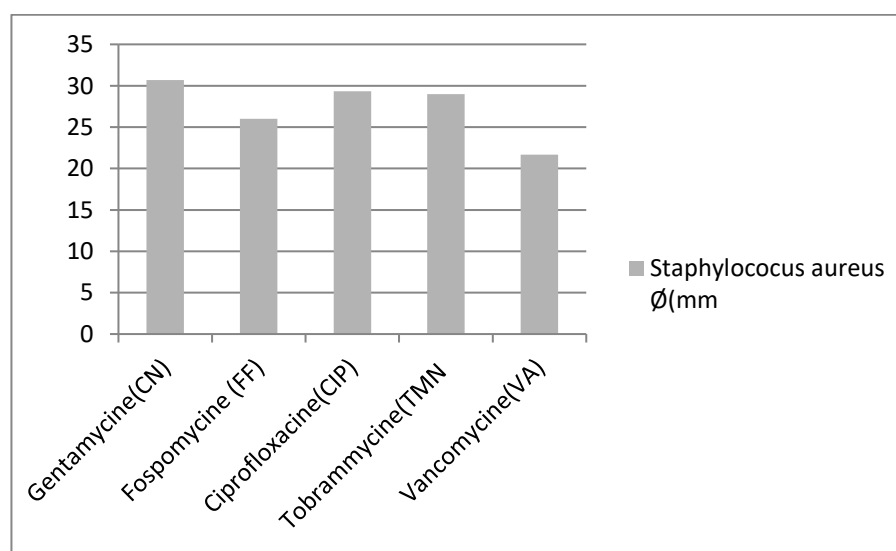


Figure 10 : Représentation graphique des diamètre d'inhibition d' *Staphylococcus aureus*. vis -à-vis de différent antibiotiques (**Gentamycine(CN)**, **Fospomycine (FF)**, **Ciprofloxacine(CIP)**, **Tobrammycine(TMN)** , **Vancomycine (VA)**).

RESULTATS

III.3.2. L'effet des antibiotiques sur la croissance *Pseudomonas aeruginosa*

La réalisation de l'antibiogramme a montré l'effet inhibiteur de la Tobrammycine (TMN), Gentamycine (CN), Ciprofloxacine (CIP), Imipénème (IPM) sur *Pseudomonas aeruginosa* avec des zones d'inhibition de 26,67, 25,42 et 29,67 mm respectivement. Par contre, la Fosfomycine (FF), Ceftazidim (CAZ) et l'Oxacilline (OX) n'ont manifesté qu'une faible activité (Tab.6 ; Fig.11).

Tab.6. Résultats de l'antibiogramme de *Pseudomonas aeruginosa*

Antibiotique	Diamètre critique (mm)			P.aeruginosa	
	R	I	S	Ø(mm)	Résultat
Fosfomycine (FF)	<16	-	>16	6	RN
Tobrammycine (TMN)	<16		>16	26,67	S
Gentamycine (CN)	<17		>17	25	SS
Ciprofloxacine (CIP)	≤21	23-24	≥21	42	S
Imipénème (IPM)	<17		≥20	29,67	S
Ceftazidim (CAZ)	< 15		≥18	8	R
Oxacilline (OX)	RN		RN	6	RN

S : Sensible, R : Résistant.

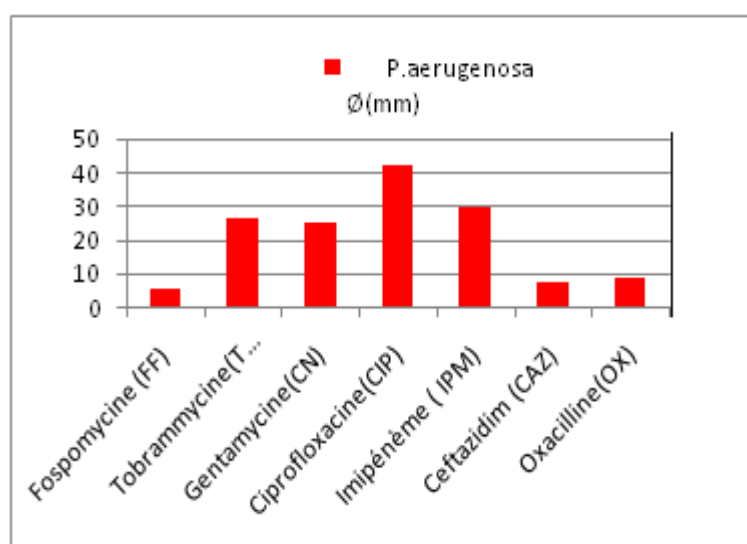


Figure 11 : Représentation graphique des diamètres d'inhibition de *Pseudomonas aeruginosa* vis-à-vis de différents antibiotiques (Fosfomycine (FF), Tobrammycine (TMN), Gentamycine (CN), Ciprofloxacine (CIP), Imipénème (IPM), Ceftazidim (CAZ), Oxacilline (OX)).

RESULTATS

III.4. Résultats d'Extraction et rendement des huiles essentielles

Après l'extraction par la méthode d'hydrodistillation on a obtenu des quantités d' huiles essentielles de *Salvia officinalis* est de couleur jaune claire (Photo18)..



Photo 18 : Les huiles essentielles de la sauge *officialisé Salvia officinalis L* obtenues par l'hydrodistillation .

Nous rapportons dans le tableau suivant la détermination des rendements des huiles essentielles M_{HE} en fonction de la quantité matière végétale de (*Salvia officinalis L.*) et du volume de l'eau distillée utilisée..

Tab.7: Détermination des rendements des huiles essentielles M_{HE} en fonction de la quantité matière végétale de (*Salvia officinalis L*) et du volume de l'eau distillée.

	masse de matière végétale m_{Mv} (g)	Masse d'huiles essentielle M_{HE} (g)	Eaux distilles utilises litres
R₁	200	0,5	1500
R₂	200	0,6	1500
R₃	200	0,52	1500

$$R_1 = m_{Mv} / M_{HE} * 100 = 0.5 / 200 * 100 = 0.25\%$$

$$R_2 = m_{Mv} / M_{HE} * 100 = 0.6 / 200 * 100 = 0.30\%$$

$$R_3 = m_{Mv} / M_{HE} * 100 = 0.52 / 200 * 100 = 0.26\%$$

RESULTATS

La détermination du rendement total d'huiles essentielles de la Sauge (*Salvia officinalis* .L) est obtenue selon l'équation ci-dessous.

$$\text{Rendement} = \frac{R_1 + R_2 + R_3}{3} = \frac{0.25 + 0.6 + 0.26}{3} = 0.27\%$$

III.5. Résultats du test du pouvoir l'activité antibactérienne

III.5.1. Résultats de l'aromatogramme

L'activité antibactérienne d'huile essentielle de sauge *oficinalis* (*Salvia officinalis* L.) est évaluée sur deux germes pathogènes d'origine hospitalière (*Staphylococcus aureus* et (*Pseudomonas aeruginosa*) après 24 heures d'incubation à une température adéquate de 37°C.

Cette activité est évaluée par la méthode d'aromatogramme, le pouvoir antibactérienne et anti fongique de cette huile essentielle est obtenu par la mesure du diamètre de zone d'inhibition en (cm) a l'aide d'une règle.

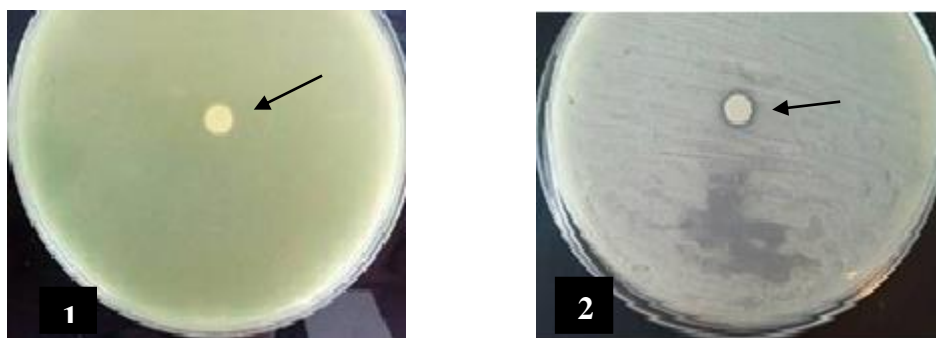


Photo 19 : Effet de l'huile essentielle des feuilles sèche de la sauge (*Salvia officinalis* L) sur la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* [1] et *Staphylococcus aureus* [2] sur milieux Mueller Hinton

RESULTATS

Tab.8: L'effet antimicrobien des huiles essentielles de *Salvia officinalis* L. sur *Pseudomonase aerugenosa* et *Staphylococcus aureus* sans utilisation de substances émulsifiantes

Microorganismes	Diamètre des zones inhibitrices de <i>Salvia officinalis</i> L. (mm)	La Sensibilités
<i>Staphylococcus aureus</i>	9	Sensible (+)
<i>Pseudomonas aerugenosa</i>	6	Non sensible (-)

D'après **Roura et al. ;2003** la sensibilité à l'essence a été classée par le diamètre des halos d'inhibition **Non sensible (-)** pour les diamètres moins de 8mm , **Sensible (+)** pour des diamètres de 8 à14mm, **Très sensible (++)** pour des diamètres de 15à 19 mm. **Extrêmement sensible (+++)** pour le diamètrés plus de 20 mm (Tab.8).

D'après les résultats mentionnés dans le tableau ci-dessous, nous avons pu tracer l'histogramme de comparaison suivant :

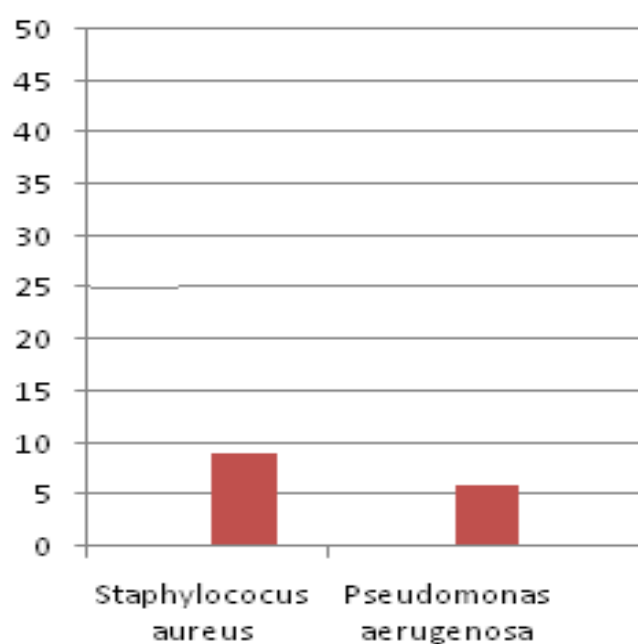


Figure 12: Histogramme de comparaison des zones d'inhibition

RESULTATS

D'après le **tableau 8** et la **figure 12**, nous ne constatons facilement que l'huile essentielle des feuilles sèches de *Salvia officinalis* L. présente une bonne activité.

Tous les résultats de l'aromatogramme (diamètres des zones d'inhibition en mm).

Tab.9: Concentration de CMI des huiles essentielles aromatiques sur les souches testées.

Concentration %	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
10	-	-
5	-	-
2.5	+	-
1.25	+	-
0.625	+	+
0.312	+	+
0.156	+	+
0,078	/	+
0,039	/	/
0,0195	/	/
0,00975	/	/
0,00487	/	/

III.4. Détermination de concentrations minimales inhibitrices (CMI) sur milieu solide

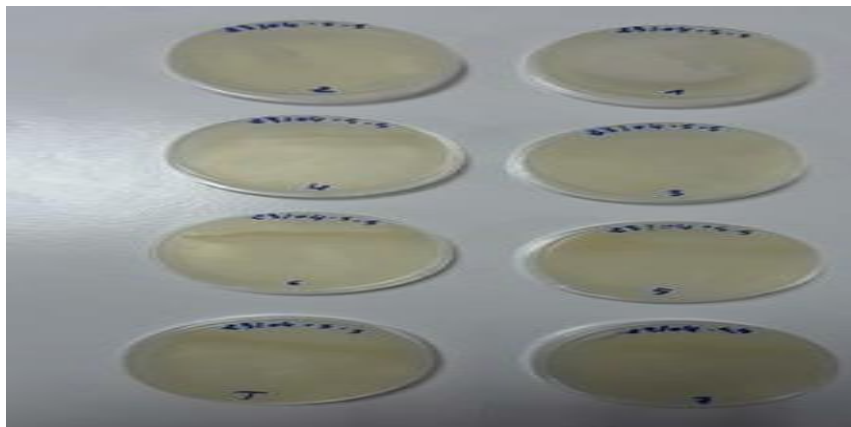


Photo : 20 Concentration minimale inhibitrice d'huile essentielle des feuilles sèches de *la sauge* (*Salvia officinalis* L) sur la croissance de *Staphylococcus aureus* sur milieu Mueller Exacte boîte 2

RESULTATS

Nous rapportons dans le tableau ci - dessus la concentration minimale inhibitrice de l'huile essentielle de *Salvia officinalis* L . (Tab.9).

La CMI enregistré pour l'huile essentielle de *Salvia officinalis* et DMDO sur *Staphylococcus aureus* est de 5%. (Photo 20).

Discussion

III.6. DISCUSSION

III.6.1. Rendement en huile essentielle

Le rendement moyen en huile essentielle a été calculé en fonction de la matière végétale sèche de la partie aérienne des deux plantes nous rappelons que les rendements de *Salvia officinalis* a été voisin de 0.27 %.

Sa pratique est très faible par rapport à ce que rapporte la bibliographie.

En effet, CHALCHAT et al en 1998, ont montré que le rendement d'extraction des huiles essentielles de *Salvia officinalis* obtenu par hydrodistillation pendant quatre heures dans un appareil Clevenger est en fonction de l'origine de la plante : France (2,05%), Hongrie (2,50 %), Portugal (2,90 %), Roumanie (2,30 %).

Cette différence du rendement de l'huile essentielle est toute a fait normale, puisqu'il dépend de plusieurs facteurs a savoir l'espèce, la géographie, la période récolte, les pratiques culturelles, la technique d'extraction, etc. **(SILANO et DELBO, 2008; MARZOUKIA et al.,2009; OLLE et BENDER, 2010).**

La séparation de l'huile essentielle âpre sa distillation est déterminée dans un large mesuré par son degré de solubilité dans l'eau. C'est ce que nous l'avons remarque durant l'étape de récupération de l'huile essentielle a partir de l'hydrolysate, ce dernier contient toujours des gouttelettes que nous n'avons pas pu les récupérer ce qui fausserait le rendement. les gouttelettes d'huile essentielle qui restent dans l'hydrolysate peuvent voir plusieurs origines, une fraction de l'huile distillée est dissoute dans l'eau et une autre est emulsionnée dans l'eau. La séparation de l'huile essentielle après condensation est en fait l'étape déterminante pour recueillir le maximum d'huile essentielle.

III.6.2. Pouvoir d'activité antimicrobienne (antibactérienne et antifongique)

La méthode de diffusion disque a permis de mettre en évidence le pouvoir antimicrobienne de l'huile essentielle les feuilles sèches *Salvia officinalis* L vis-à-vis des bactéries testées. La souche de *Staphylococcus aureus* c'est montré sensible, mais très résistant à la souche de *Pseudomonas aeruginosa*

Discussion

Ces résultats ont montré que *Staphylococcus aureus* était plus sensible que *Pseudomonas aeruginosa* aux huiles essentielles. .

Cette sensibilité plus marquée des gram+ par rapport aux Gram négatif vis a vis des huiles essentielles a été déjà observée dans plusieurs études antérieures (**COX et al ; 2001.**).

Des études antécédentes ont démontré que la majorité des huiles essentielles testées pour leurs propriétés antibactériennes ont un effet plus prononcé contre les bactéries à Gram positif. La résistance des bactéries à Gram négatif est attribuée à leur membrane externe hydrophile qui peut bloquer la pénétration de composés hydrophobes dans la membrane cellulaire cible (**WAN, 1998.**). Chez les bactéries à Gram positif, le peptidoglycane est très épais et associé à des protéines pariétales exposées et à des structures polyosidiques (acides lipoteichoïques, acides teichoïques...) Par contre chez les bactéries à Gram négatif, le peptidoglycane est très fin et associé à une enveloppe externe complexe définissant un espace périplasmique. Cette membrane externe est une bicouche lipidique asymétrique hydrophobe constituée de phospholipides, de protéines (porines...) et lipopolysaccharides (LPS). L'espace périplasmique est rempli d'enzymes qui dégradent les substances complexes pour qu'ils puissent traverser la membrane cytoplasmique, et inactivent les produits chimiques toxiques (antibiotiques, métaux lourds...) (**WAN, 1998 et 2000.**).

III.6.3.Détermination de concentrations minimales inhibitrices (CMI) sur milieu solide

Des tests de l'activité antibactérienne évaluée, il ressort que les huiles essentielles de *Salvia officinalis* L. sont très efficaces contre toutes les bactéries testées et plus particulièrement à la concentration 0.156 % .

La concentration de l'huiles essentielle de *Salvia oficinalis* L (5%). a été suffisante pour arrêter la croissance de *Staphylococcus aureus*.

Conclusion

Conclusion

L'aromathérapie elle est utilisée dans de nombreux domaines, mais les huiles essentielles sont particulièrement intéressantes par leurs propriétés anti-infectieuses. De plus en plus d'études scientifiques sont menées dans le domaine de l'aromathérapie et mettent en évidence le rôle important des huiles essentielles en thérapeutique. Dans ce contexte, il est important d'utiliser les huiles essentielles avec précaution pour toutes les voies d'administration que ce soit par voie orale ou externe. De plus, il n'est pas question de remplacer les médicaments par des huiles essentielles.

Des soins moins nombreux, qui durent moins longtemps et donc occupent moins de personnels soignants reviendraient-ils moins chers que les soins classiques ?

L'être humain recherche dans son environnement de quoi soulager ses maux et traiter ses blessures. La médecine moderne occidentale a rejeté la plupart de ces recours pour développer des médicaments chimiques et une technique de soins sophistiquée. Elle continue cependant d'utiliser certains remèdes à base des plantes médicinales. Une tendance récente conduit même à rechercher dans les plantes de nouveaux produits de substitution pour certaines maladies : cancer, paludisme... Plus de 200 000 espèces végétales sur les 300 000 recensées de nos jours sur l'ensemble de notre planète vivent dans les pays tropicaux d'Afrique. L'histoire de la médecine traditionnelle montre l'importance de ces espèces dans les thérapies, toutes les sociétés traditionnelles ayant puisé, pour leurs soins de santé, dans cette pharmacopée végétale d'une très grande richesse. De nos jours de nombreux travaux consacrés à la chimie et à la toxicologie des plantes aromatiques et médicinales ont contribué à améliorer la connaissance scientifique dans ce domaine et à l'élaboration de protocoles standards de phytochimie et de screening biologique. Ces derniers ont tenu une place prépondérante dans l'art de guérir. Selon les cultures et les époques, elles ont été exploitées sous différentes formes, de diverses manières et pour les usages les plus variés. Les traitements à base de plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques (considérés comme la solution quasi universelle aux infections graves) décroît, aussi à cause du coût élevé des produits pharmaceutiques de synthèse, la

plupart des populations mondiales ne sont pas en mesure de s'offrir les soins de santé modernes, et c'est pourquoi elles se tournent vers la médecine populaire et les plantes médicinales, ou simples, pour se soigner.

L'Algérie, par sa situation géographique, offre une végétation riche et diverse. Un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales y poussent spontanément.

L'intérêt porté à ces plantes n'a pas cessé de croître au cours de ces dernières années. Ceci nous a amené à nous pencher sur l'étude de l'activité antibactérienne et antifongique des huiles essentielles obtenues par la méthode d'extraction au moyen d'hydrodisillation à partir de deux plantes aromatiques : *telles que Salvia officinalis*. Cette dernière et d'après nos résultats obtenus s'est montré plus efficace vis-à-vis des microorganismes pathogènes.

Référence bibliographique

Références bibliographiques

- ACHAK N.,2006** : Contribution à la valorisation des substances naturelles : Etude des huiles essentielles des cupressacées de la région Tensift Al Haouz – Murrakech. Thèse III° Cycle, Université Cadi Ayyad, Fac. Sciences Marrakech, p304.
- AGBO-GODEAU S. et GUEDJ A., 2005** : Mycoses buccales. *EMC-Stomatologie*1:p 30-41.
- AUDIGIE C.L., DUPON G. et ZONSGAIN F., 1995** : Principes des méthodes d'analyse biochimique. T1, 2ème ED. Doin, Paris, p. 44.
- ASTRAGNEAUP., 1998** : Epidémiologie des infections nosocomiales Rev.Prat.48 :1525-1530.
- AYAD N., HELLAL B., HELLAL T., RAHMANI A. et BENSMIRA Z., 2014** : Qualités nutritionnelles de l'armoise blanche des parcours steppiques du sud de la préfecture de Tlemcen. *Revue Ecologie-Environnement* (10) ; p. 71-74.
- BABA AISSA F., 2000** : Encyclopédie des plantes utiles. Flore d'Algérie et du Maghreb. Substances végétales d'Afrique, d'Orient et d'Occident. Edition librairie moderne. Rouiba.
- BAKKALI F., AVERBECK S., AVERBECK D. and IDAOMAR M., 2008** : Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, p 46: 446-475.
- BALZ R., 1986** : Les huiles essentielles et comment les utiliser. ED Lavoisier. Paris.
- BARKELY T. M., BROUILLET L. and STROTHER J. L., 2006** : Flora of North America – Asteraceae. Oxford University Press, New York. P193. *Artemisia*. Ed. Taylor, France .p280.
- BARKIRE B., 1996** : Les ressources naturelles d'origine végétale au Niger : les possibilités de leur valorisation sous forme de biopesticides. séminaire-atelier, Niamey, Niger, 28 octobre-8 novembre 1996.
- BASER K.H.C. and BUCHBAUER G., 2010** : Handbook of essential oils: Science, Technology, and Applications. Ed. *Taylor and Francis Group, LLC*. United States of America, p 994.
- BEAUCAIRE G., 1997** : Les infections nosocomiales *RevPrat(Paries)*47 :201.
- BELAICHE P., 1979** : Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. Tome 1 : l'aromatogramme .éd. Maloine. Paris.
- BELOUED A., 2001** : Plantes Médicinales D'Algérie. Ed 2. Office des Publications universitaires, BEN- AKNOUN (Alger). Belaiche, p1979, L'aromatogramme, Traité de phytothérapie et d'aromathérapie, M.S. A .Editeur, Paris, Tome 1, p : 204.
- BEN AMOR B., 2008** : Maitrise de l'aptitude technologique de la matière végétale dans Les opérations d'extraction de principes actifs ; texturation par détente instantanée. Thèse doctorat : Université la ROCHELLE, France .p207.
- BENCHEIKH H., 2005** : Contribution à l'étude de la composition, de l'activité antimicrobienne et de la cytotoxicité des huiles essentielles de *Thymus fontanesii* et de *Foeniculum vulgare*. Mémoire de Magistère, Département de biologie, Faculté des sciences, UFA de Sétif.
- BENDAHOU M., MUSELLI M., GRIGNON-DUBOIS M., BENYOUCEF M., DESJOBERT J.M.D.A.F. and BETNARDINI .and COSTA., 2008** : Antimicrobial activity and chemical

composition of *Origanum glandulosum* Desf. Essential oil and extract obtained by microwave extraction : Comparison with hydrodistillation. Food Chemistry. 106 : p132-139J.

BENJILALI B., TANTAOUI-ELARKI A. et ISMAILI-ALAOUI M., 1986 : «Méthode d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé ». Plant. Méd. Phytothérapie. 20, p : 155-167.

BENNETT R.J. and JOHNSON A.D., 2003 : Completion of parasexual cycle in *Candida albicans* by induced chromosome loss in tetraploid strains. Embo J 22 : p 2505-2515.

BERCHE P., GAILLARD J.L. et SIMONET M., 1989 : Bactériologie : les bactéries des infections humaines. Paris Flammarion – médecine-science .p 274-236..

BESOMBES C., 2008 : Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydrothermomécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. Thèse Doctorat. Université de La Rochelle, p 41-45.

BHASKARA-REDDY M.V., ANGERS., GOSSELIN A. and ARUL J., 1998 : Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits. *Phytochemistry*, 42 (8), p 1515-1520.

BHAVAN P.S., RAJKUMAR R., RADHAKRISHNAN S., SEENIVASAN C. and KANNAN S., 2010 : Culture and Identification of *Candida albicans* from Vaginal Ulcer and Separation of Enolase on SDS-PAGE. International Journal of Biology 2: p 84-93.

BOGCHI G.D., SRIVASTAVA G.N., FUITSAND. and SEED., 2003 : Spices and Flavoring (Flavouring) crops / fruits seed Elsevier Science Ltd, p 5465-5477.

BOIRON P., 1999 : Etude des infections fongiques : des avancés multiples. Option/Bio 238 : 4-5

BONN. et BLANC J.M., 2008 : Annales de dermatologie et vénéréologie, Item 87- Infections cutanéomuqueuses bactériennes et mycosiques : *Candida albicans*. 135(115) : p 42-48.

BOUDJELAL A., 2013 : Extraction, identification et détermination des activités biologiques de quelques extraits actifs de plantes spontanées (*Ajugaiva*, *Artemisia herba alba* et *Marrubium vulgare*) de la région de M'Sila, Algérie. Thèse doctorat : Biochimie Appliquée. Annaba : Université Badji Mokhtar, p 61.

BOULLARD B., 2001 : Plantes médicinales du monde-Croyances et Réalités. Ed ESTEM, Paris, p 645.

BOURKHISS, M., HNACH, M., BOURKHISS, B., OUHSSINE, M., ET CHAOUCH A., (2007), Composition chimique et propriétés antimicrobiennes de l'huile essentielle extraite des feuilles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) du Maroc, *Afrique Science*, 3 (2), 232-242.

BOUZIDI N., 2016 : Etude des activités biologiques de l'huile essentielle de l'armoise blanche « *Artemisia herba alba* Asso ». Thèse de Doctorat en Sciences de la Vie, Université Mustapha Stambouli Mascara.

- BOUZOUITA N., KACHOURI F., BENHALIMA M.etCHAABOUNI M., 2008** : Composition chimique et activités antioxydant, antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea*. Journal de la Société Chimique de Tunisie, 10, p 119-125.
- BRAGA DE SOUZA JV., TALHARIC., REINEL D.and TALHARI S., 2010** :Utilization of experimental design and surface response methodology to study the influence of glucose and ammonium sulphate in the chlamydosporulation of *Candida albicans* FMT123-05. Journal of Yeast and FungalResearch1 : p 30-34.
- BRUNETON J.,1999** : Pharmacognosie, Photochimie. Plantes médicinales Edition technique et documentation ,3^e édition Lavoisier, Paris p 1120.
- BRUNETONJ., 2005** :.Pharmacognosie, Photochimie. Plantes médicinales. 3^eédition 2005.Edutions & Tec Doc médicales international.
- BRUT S., 2004** : Essential oils : their antibacterial properties and potential applications in food review.Int.J.Food microbiol.94 : p 233-253.
- CAUDEM. et JARDY A., 1996** : Méthodes chromatographiques. Dossier p1445. Base documentaire : Techniques d'analyse. Vol ; papier TA2.
- CARBONNELLE B., DENIS F., MARMONIER A., PINON G.and VARGUES R.,1987** :bactériologiemédicinale. TechniqueUsuelle p14, 133 et 416.
- CARLES. et PHARM., 2003** : Les antifongiques dans le traitement des infections invasives.*Pharmactue*36(1): p25-41.
- CARRE P., 1953** : Précis de technologie et de chimie industrielle.T3.Ed.BallièreJB.etfils
- CORNELIS P. et PSEUDOMONAS., 2008** :Genomics and Molecular biology (1 st éd).
- COLINEW. etWRIGHT., 2002** : *Artemisia*.Ed.Taylor, france.p280.
- COURVALLIN P., GOLDSTEIN F., PHILIPPON A.et SIROT., 1985** :L'antibiogramme.Paris,mpcvideom.
- DAVIDSON P. M., SOFOS J. N.and BRANEN A. L.,2005** :*Antimicrobials in Food* (éd. Third Edition). BocaRaton : CRC Press , p429.
- DE MAACK F. et SABLIER M., 1994** :Couplage chromatographiques avec la spectrométrie de masse. Dossier: P2614. Vol papier n°: TA3. Bases documentaires, Techniques d'analyse.
- DESJOBERT J. M., BIANCHINIA., TOMMY P., COSTAJ.et BERNARDINIA.F., 1997** : Etude d'huiles essentielles par couplage chromatographie en phase gazeuse / spectrométrie de masse. Application à la valorisation des plantes de la flore Corse. Analysis, 25 (6) : p 13-16.
- DEVELOUX M.et BRETAGNE S., 2005** : Candidoses et levures diverses.*EMC.Maladies infectieuses* 2:p119-139.
- DEYSONG., 1967** : Organisationet Classification des plantes vasculaires, édition SE.D.E.S, tome I ,1967.
- ERLER, F., ULUG I., AND YALCINKAYA B., (2006)**. Repellent activity of five essential oils against *Culex pipiens*, *Fitoterapia*, 77, 491-494.
- ERNESTJ., JOSEPHL. et EDWARDA., 1973** : Microbiologie médicale. Paris, France p 302-303.
- FAUCHERE J.L.et AVRILJ.L.,2002** : Bactériologie générale et médicale P : 368.
- FEIGIN. et CHERRY. , 2004** : Text book of paediatricinfectiousdiseases, 5thEdition, V.B.Sanders company.Canada.

- FERHATM.A., MEKLATIB. Y.and CHEMATF., 2007** : Comparison of different isolation methods of essential oil from Citrus fruits cold pressing,hydrodistillation and microwave « Dry » distillation. *FLAVOUR f Rragr. J .22/* p 494-504.
- FIGARELLA J.et LEYRALG., 1998** : Microbiologie techniques : 2, Documentation technique.2ème édition-Biologie technique. Bordeaux: p 255.
- FRANCE-IDAJ., 1998** : Comment s'assurer de la pureté d'une huile essentielle, Info – essences. p7 : 1-2.
- FRANCHOMME P. et PENOEL D., 1990** : Matière médicinale aromatique fondamentale (317-406), livre quatrièmes, l'aromathérapie exactement, encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles .R.Jollois Edit, limoge, p 446.
- GHARABIZ. et SAND R.L., 2008** : *Artemisia herba alba* asso. A guide to Medicinal Plants in North Africa :p 49- 49.
- GHASEMI., PIRBALOUTI A., RAHIMI E.and MOOSAVI S. A.,2010** :Antimicrobial activity of essential oils of threeherbsagainst *Listeria monocytogenes* on chicken frank furters. *Acta agriculturae Slovenica*, 95(3), p 219 - 223.
- GUARRERA P. M.,1999** :Traditional antielmintic, antiparasitic and repelent uses of plants in central Italy. *Journal of Ethnopharmacology* , 68, p183-192
- GUIGNARD J.L., 2000** : Biochimie végétale. 2ème Ed. De l'abrégé Dunod, Paris, p177-185.
- HAYASHI K.and HAYASHI T., 1994** :Virucida leffects of the steam distillate from Houttuynia cordata and its components on HSV-1, influenza virus and HIV. *Planta Medica*, 61, p237–241.
- HOHMANN J., REDEID., MATHEA I. and BLUNDEN G., 2003** :Phenylpropanoid glycosidesand diterpenoids from *Salvia officinalis*. *Biochemical Systematics and Ecology*2003 ; 3 : p 427 – 429
- HOPP U. et BALTENSWEILER J.,2009** : Mycoses-Mycoses cutanées-Candidoses-Moniliases ou Monilioses,causes et facteurs de risque.France.
- JORGE F.S., FERREIRA., P. PEADEN.and J. KEISER, 2011** :In vitro trematocidal effects of crudeal coholic xtracts of *Artemisia annua*, *A. absinthium*, *A. siminatriloba*, and *Fumariaofficinalis*.Trematocidal plant alcoholicextracts. *ParasitolRes*(2011) 109:p1585–159.
- KALEMBA D. and KUNICKA A., 2003** :Antibacterialand antifungalproperties of essential oils "Review". *Curr. Med. Chem*, 10, p813-829.
- KAMATOUG. P. P., VILJOENA. M., GONO-BWALYAA. B., VAN ZYL R. L., VUUREN V. S. F., LOURENS A. C. U., BASER K H. C., DEMIRCI B., LINDSEY K. L., STADEN V. J.and STEENKAMP P., 2005** : The In vitro pharmacological activities and a chemical investigation of three South African *Salvia* species. *Journal of Ethnopharmacology*2005 ;102 :p 382 -390.
- KENNEDY D. O.and SCHOLEYA. B. ,2005** : Sage and brain function. *Nutrition Abstract And Reviews: Serie A* 2005 ; 75(8) :p 25 - 31. 145.
- KHAJEHM., YADOLLAH YAMINI Y. ,BEHRAMIFAR N . , SEFIDKOM F.and REZA P. IMORADEI M., 2005** : Comparison of essential oils compositions of *Ferulaaassa –Foetida* obtained by supercritical carbondioxide extraction and hydrodistilation méthodes. *Food Chemistry*, 91 : p 639-644.
- KIM J., MARSHALL M. R. and WEI C., 1995** :Antibacterial activity of some essential oil component sagainst five food borne pathogens. *J. Agric. Food. Chem.* , 43, p 2839-2845.

- LAMARTIA., BADO C A., DEFFILEUX G. et CARDEJ .P., 1994** : Biogénèse des monoterpènes I-localisation et sécrétion. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 133 :69-78.
- LAOUER H., 2004** : Inventaire de la flore médicinale utilisée dans les régions de Sétif, de Bejaia, de Msila et de Djelfa, composition et activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Ammoide spusilla* et de *Magydaris pastinacea*. Thèse de Doctorat d'état, Département de Biologie, Faculté des sciences, UFA de Sétif.
- LATTAOUI N. and TANTAOUI-ELARAKI A., 1994** : Individual and combined antibacterial activity of the main components of thre ethyme essential oils. *Riv. Ital. EPPOS*, 13, p 13-19.
- LEGRANDG., 1993** : Manuel de préparateur en Pharmacie, Masson, Paris.
- LOUP, 1991** : Bactériologie, technique en bactériologie chimique 2eme édition, P135, 137.
- LUCCHESIM.E., 2005** :*Extraction Sans Solvaont Assistée par micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huilesessentiels*,thèse doctorat : Université de la Reunion, Faculté des Sciences et Technologies France, p146.
- MACHET L., VAILLANT L. A. et CKER O., 2006** :Dermatologie en gynécologie obstétrique : page 137.
- MADHAVID L., DESHPANDES. and SALUNKHE D.K.,1996** :Food Antioxidants,Technological, Toxicological, and Health Perspectives, Marcel Dekker, Inc. New York, p.65.
- MADIGANM. et MARTINKOJ., 2007** : Brock-Biologie des micro-organismes.11^{eme}édition.Pearson Education. France. p 1047.
- MAGINA M D A., DALMARCO E M., WISNIEWSKI A., SIMIONATTO E L., DALMARCO J B., PIZZOLATTI M G., AND BRIGHENTE I M C., (2009)**. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Eugenia* species, *J. Nat. Med.* 63, 345-350.
- MANGENA T. and MUYINA N.Y.O., 1999** :Comparative évaluation of the antimicrobial activités of essential oils of *Artemisia afra*, *Pteronia incana* and *Rosmarinus officinalis* on selectedbacteria and yeaststrainsLett .Appli Microbial. 28, p 291-296.
- MARCHAL N., BOURDON J .L. et RECHARDC., 1987** : Les milieux de cultures opour l'isolement et identification biochimique des bactéries ; troisièmes édition remaniée Paris France
- MATTEUCCIE. and GIAMPIEL., 2008** : Proposal open for discussion : defingared diagnostic procedures in experient al diabet es research. *J Etho Pharmacol*, 115 : p 163-72
- MEYER A., DEIANA J. et BERNARD A., 2004** : Biosciences et techniques.Edition DOIN. France. p304.
- MESSAIL L ., 2011** : étude phytochimiqued'une plante medicinale de l'est algerien(artemisia herba alba) .Thése Doctorat : Chimie Organique. Contstantine : université de Mentouri,p 104.
- MILADINOVIC D. and MILADINOVIC L J., 2000** : Antimicrobial activity of essential oil of sage from Serbia. Series:Physics, Chemistry and Technology 2000; 2(2): p 97 - 100.
- MOHAMEDA.H., EL-SAYEDM.A. and MOHAMEDN.S., 2010** : Chemical constituent sand biological activities of *Artemisia herba alba*. *Records of natural products*; 4: p 1-25.

- MOLEYAR V., AND NARASIMHAM P., (1986).** Antifungal activity of some essential oil components, *Food Microbiology*, 3, 331-336.
- MULTONJ L., 2002 :** Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires, Paris, Lavoisier, p.207-231.
- NAUCIEL C.et VILDE JEAN-LOUIS., 2005 :** Bactériologie médicale .Edition Masson ; 2-294-01858-3, p77-80.New York, N.Y.
- OKOH O. ,2010 :** Chemical transformations and phytochemical studies of bioactive components from extracts of *rosmarinus officinalis*L. A thesis submitted in fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy, 198pp. Faculty of Science and Agriculture at the University of Fort Hare.
- OZENDAP., 1983 :** Flore du sahara. Edition CNRS. 2e édition, p416-442.
- PARIS M.et HURABIELLEM., 1981 :** Abrégé de matière médicale (pharmacognosie) Tome. Ed. Masson, p 339.
- PELLAS F., PETIOT S., KOTZKI N. et SOTTO A., 2002 :** Infection nosocomiales et médecine physique et de réadaptation .Paris . France, p2.
- PELLECUER J., JACOB M., SIMEON BOUCHBERG M., (DE), (1980).** Essais d'utilisation d'huiles essentielles de plantes aromatiques méditerranéennes en odontologie conservatrice. *Plant Médecin Phytothér*; 14: 83-98.
- PENOËL D., 1991 :** Médecine aromatique, médecine planétaire vers la fin d'une survie artificielle .Éditions Roger Jollois.
- PERRYJ.J., STALEY J.T.et LORYS., 2004 :** Microbiologie. Edition Dunod. Paris, p 891
- PIBIRI M. C.,2006 :** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse Doctorat, EPFL Lausanne, p161.
- PILLET C.H., BOURDON B., TOMA N., MARGHAL. C.et BALBASTE. N., 1986 :** Bactériologie médicale et vétérinaire, systématique bactérienne, 2^{ème} édition, Masson.
- PINJON E., SULLIVAN D., SALKIN L., SHANLEY D.and COLEMAN D., 1998 :** Simple, inexpensive, reliable method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*, p77.
- PFALLER M A., 2002 :** Focus on fungal infectious 3. Phoenix Arizona March.
- PLATZERN., 2002 :** Application de la RMN à la détermination des structures. Base Documentaire, Techniques d'analyse, Dossier : p1092, vol. TA1.
- PONCEA.G., FRITZR., DEL VALLEC.and ROURA S.I., 2003 :** Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard, *Lebensm.-Wiss.u.-Technol.* 36, p.679-684. *Journal of Clinical Microbiology* 36 : p2093-95.
- POTTIERG., 1981 :** *Artemisia herba-alba* .Flore de la Tunisie : Angiospermes dicotylédones gamopétales, p 1012.
- PRADEAU D.et DAUPHINC., 2007 :** Chromatographie planaire : applications. Dossier p1476, Base documentaire : Techniques d'analyse, vol. Papier n° TA2.
- PROKSCH P., HANSEL R., KELLER K., RIMPLER H., SCHNEIDER G. and ANDHRS G., 1992 :** Artemisia. In Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis. Springer-Verlag, Berlin, p 357-377.
- QUENZEL P. et SANTA S., 1963 :** Nouvelles flores d'Algérie et des régions désertiques méridionales . Tome II. Ed. CNRS Paris p 1963-1170.

- QUEZEL P. et SANTA S., 1963** : Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome II. Paris, France : éd CNRS, p 603.
- RABBANIM., SAJJADIS. E., JAFARIAN A. and VASEGHIG., 2005** : Anxiolytic effects of *Salvia reuterana* boisson the elevated plus-maze model of anxiety in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 2005 ; 101: p 100 - 103.
- RACHARD F., 1992** : Manuel de corps gras, Paris, Ed : Lavoisier, Tec & Doc. , p 1228- 1242.
- RACHARDH., 1992** : Epices et aromates. Technologie et Documentation Lavoisier .Paris, p339.
- RADULESCU V., CHILIMENTS. and OPREA E., 2004** : Capillary gas chromatography-mass spectrometry of volatile and semi-volatile compound of *Salvia officinalis*. *Journal of Chromatography A* 2004 ; 1027 :p121 - 126.
- RAHAL S., 2004** : Chimie des produits naturels et des êtres vivants. O.P.U. Edition. p.162.
- RAPP R. P., 2004** : Changing strategies for the management of invasive fungal infections. *Pharmacotherapy* , 24, p 4S-28S.
- RAYAN K J. and RAY C.G., 2004** : Sherris Medical Microbiology (4thed). McGRAW Hill. ISBN 083858299.
- REGNAULT J.P., 2000** : Microbiologie générale. Microorganismes commensaux. Dcari empritréal. Vigot Paris. Chapitre 11 :p 420-328.
- REGNAULT J. P., 2002** :.Eléments de microbiologie et d'immunologie. Microorganismes eucaryotes .Canada: p70-71.
- REGNAULT, ROGER and CHAMRAOUI A., 1995** : Fumigant toxicactivity and reproductive inhibition induced by monoterpenes on *Acanthoscelides obtectus*(Say) (coleoptera), a bruchid of kidneybean (*Phaseolus vulgaris*L.). *J. Storodres* 31, p 291-299.
- REMI C., 2007** : Référentiel en microbiologie médicale (bactériologie et Mycologie) 3eme édition ; par le groupe Rémic de la SFM, P 24-287, 367.
- ROBERT L., 1982** : Bactériologie médical, éditeur place de l'odean. Paris, P: 213-226.
- ROUESSAC F. et ROUESSAC A., 2004** : - Analyse chimique, méthodes et techniques instrumentales modernes, méthodes séparatives. 6ème Ed. Dunod, Paris, p.102.
- SAIDO., KHALIL K., FULDER S. and AZAIZELS H., 2002** : Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in israil, the golenheight and the wastbank region, *Journal of Ethnopharmacological*, p 83 : 251-263.
- SALEH N. A. M., EL-NEGOUMY S. I., ABD-ALLA M. F., ABOU-ZAID M., DELLAMONICA G. and CHOPIN J., 1985** : Flavonoids glycosides of *Artemisia monosperma* and *A. herba-alba*. *Phytochemistry*, p 24 (1), 201-203.
- SALEH N. A. M., EL-NEGOUMY S. I. and ABOU-ZAID M., 1987** : Flavonoids of *Artemisia judaica*, *A. monosperma* and *A. herba-alba*. *Phytochemistry*, p 26 (11), 3059-3064.
- SCHAECHTER M. et EISENSTEIN., 1999** : Microbiologie et pathologie infectieuse. Paris : Boeck- Edition, p : 181-284
- SCHNITZLER P., SCHON K. and REICHLING J., 2001** : Antiviral activity of Australian teatree oil and eucalyptus oil against the herpes simplex virus in cell culture. *Pharmazie*, 56, p 343-347.
- SCHWEDT G., 1993** : Méthodes d'analyse. Ed. Flammarion.
- Segal R., Feuerstein I. and Danin A., 1987** : Chemotypes of *Artemisia herba-alba* in Israel based on their sesquiterpene lactone and essential oil constitution. *Phytochemistry*, 15(4), p 411-416.

- SMITH C.K., MOORE C.A., ALAHIE.N and SMARTA.T., 2000** : Human skin absorption metabolism of the contact allergen cinnamic aldehyde and cinnamic alcohol. *Toxicol. App. Pharmacol* p 168,189-99.
- SOLIMAN K M., AND BADEAA R I., (2002)**. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi, *Food Chem. Toxicol.* 40, 1669-1675.
- SUDAN O., ROCCARO A., RITA BLANCO A., GIULIANO F., RUSCIANO D.and ENEA V., 2004** : Epigallocatechin-Gallate Enhances the Activity of Tetracycline in Staphylococci by Inhibiting Its Efflux from Bacterial Cells. *Antimicrob Agents Chemother*, 48 (6), p 1968–1973.
- STAMOS J.K .and ROWLEYA.H., 1995** : Candidemia in a pediatric population. *Clinical Infectious Diseases* 20 : p 571-575.
- SVOBODA K. P.and HAMPSON J. B., 1999** : Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants :antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. <http://www.csl.gov.uv/ienica/seminars>.
- SVOLBOD A. And GREENAWAYR .I., 2003** : Investigation of volatile oil glands of *Satureja hortensis* L. (Summer savory) and phytochemical comparison of different varieties the international Journal of Aromatherapy 13 :p195-202.
- TEPE B., SOKMEN M., AKPULAT H. A.and SOKMENA., 2006** : Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey. *Food Chemistry* 2006 ; 95 : p 200 - 204.
- TEUSCHER E., ANTON R. et LOBSTEIN A.,2005** : Plante aromatiques. Epices, Aromates, condiment et huiles essentielles .Ed. TED & DOC. Lavoisier. p 444.
- TIM CUSHNIE T. and ANDREW J.,2005** :Antimicrobial activity of flavonoids "Review". *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26, p 343–356
- TORTORA G.J., FUNKE B.R.et CASE C.L.,2003** :Introduction à la microbiologie. Edition du nouveau pédagogique .Canada, p945.
- TWAIJ HA. and AL-BADR A., 1988** :Hypoglycaemic activity of *Artemisia herba-alba*.J *Ethnopharmacol*.vol. 24 (2-3):p 123–126.
- ULTEE A., GORRIS L. G. and SMID E. J., 1998** : Bactericidal activity of carvacrol towards the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *J. Appl. Microbiol.* , 85(2), p 211-218
- WALSH G., 2003** : Biopharmaceuticals: Biochemistry and Biotechnology, 3rd. Chichester: Wiley, England
- WANG L. and WELLER C.L., 2006** :Recent advances in Extraction of nutraceuticals from plants *Trends in Food Science & Technology* ,17 : p 300-312.
- WERNER M., 2002** :Les huiles essentielles : réveil du corps et l'esprit. Ed. Vigot collection Sante bienêtre, p95
- WHITENAYM. and BACHEWICH C., 2007** : Morphogenesis in *Candida albicans*. *Annual Review of Microbiology* 61: p 529-553.
- YILDIZ K., BASALAN M., DURU O. And GOKPINAR S.,2011** :Antiparasitic Efficiency of *Artemisia absinthium* on *Toxocara cati* in Naturally Infected Cats. *Turkiye Parazit Derg*, 35: p 10-4.
- ZAMBONELLI A., D'AURELIO A., SEVERRI A., BENVENUTI E., MAGGI and BIANCHI A., 2004** : Chemical composition and fungicidal activity of commercial oils of *Thymus vulgaris* L.J.Essent.Oil.Res.p16, 69-64.

Références Bibliographiques

ZERROUKI K., 2017 : l'effet antioxydant de quelques plantes médicinales sur la neurotoxicité et les maladies Neurodégénératives dues aux métaux lourds (aluminium et plomb) : « étude expérimentale chez la souris », Thèse de Doctorat en Sciences, Univ. Mostaganem, p 196.

ZHANG C Q., LIU Y H., AND ZHU G N., (2010). Detection and characterization of benzimidazole resistance of *Botrytis cinerea* in greenhouse vegetables, *Eur. J. plant Pathol.* 126 (4), 509-515.