



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Mémoire de fin d'études

Présenté par

Belabbas Hafsa et Riad Fatiha

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER

Spécialité: BIOTECHNOLOGIE ET VALORISATION DES PLANTES

Thème

**Etude de l'effet antimicrobien des huiles essentielles de
Salvia officinalis sur les bactéries (*Staphylococcus aureus*,
Pseudomonas aeruginosa, *Escherichia coli*).**

Soutenu publiquement le 30 /09/2019

Devant le jury

Président	M. GHELAMALAH. A	MCA	Université de Mostaganem
Encadreur	M. BEKADA. A	Professeur	C.U.Tissemsilt
Examineur	Mme. BERGHEUL. S	MCB	Université de Mostaganem

Année universitaire : 2018/2019



Remerciement

Remerciements

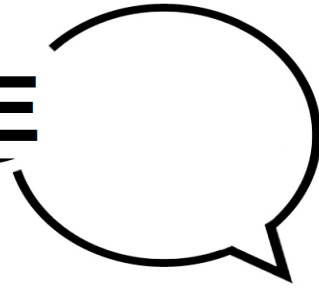
*Nos remerciements s'adressent tout d'abord à **DIEU**, le tout puissant
Qui nous 'a tracé le chemin de notre vie et accordé la volonté, la santé et la
Patience nécessaire à la réalisation de ce mémoire;*

*Nous tenons à remercier en premier lieu notre promoteur
M BEKADA. A de nous avoir accompagné durant cette recherche, pour ses
orientations, ses encouragements et surtout pour ses précieux conseils.
Nous tenons à remercier les membres de jury d'avoir accepté d'examiner notre
travail.*

*Nous tenons également à exprimer notre reconnaissance et notre sincère
Gratitude à tous les enseignants qui nous ont accompagnés durant ce cursus
Universitaire.*

*Enfin, il nous est agréable d'adresser nos remerciements à tous ceux qui
Ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.*

DÉDICACE



Je dédie ce modeste travail à :

Mes chers parents qui m'ont tout donné.

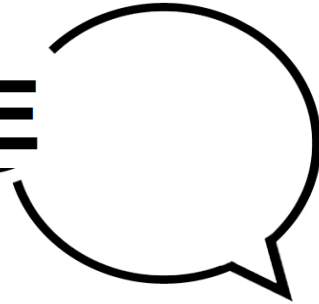
A ma chère sœur *Fatima Zahra*

A mon cher frère *Sofiane*

A mes très chères amies : *Asma* et *Hadjer*

B.Hafsa

DÉDICACE



Je dédie ce travail à :

Ma très chère mère que dieu la protège pour son soutien depuis toujours

Mon très cher mari pour son soutien et ses encouragements

Mes deux princes : Abdelhak et Aboubakr

Mes frères : Mohamed, Ahmed, Ramadan et Mouloud.

Mes sœurs : Houria, Malika, Zahra et Fatima et tous leurs enfants.

Toute la famille Riad & Boukhatem surtout mes chères belles sœurs Hayet & Lamia

Mon binôme sœur que j'apprécie énormément

Mes collègues de la promotion Master 2 pour les sympathiques moments qu'on a

passé

Ensemble.

R. Fatiha

Tableau de matière

Liste des figures	A
Liste des tableaux	B
Liste des abbreviations	C
Introduction	1

Etude Bibliographique

CHAPITRE I

Partie I: Généralités Sur *Salvia officinalis*

I) Généralités sur <i>Salvia officinalis</i>	02
I.1. Description botanique et répartition géographique	02
I.2. La sauge (<i>Salvia officinalis</i>)	02
I.3. Historique	03
I.4. Description morphologique	03
I.5. Classification	03
I.6. Habitat	04
I.7. Composition de la sauge	04
I.7.1. Parties utilisées	04
I.7.2. Principaux constituants de <i>Salvia Officinalis</i>	04
I.7.3. Composition chimique de l'huile essentielle de la sauge	04
I.8. Principaux usages traditionnelles de la sauge	05
I.8.1. Usages pharmaceutiques	05

I.8.2. Usages cosmétologiques	06
I.8.3. Usages alimentaires	
I.9. La toxicologie	06
I.10. Propriétés thérapeutiques de <i>Salvia officinalis</i>	06

CHAPITRE I:

Partie II : Association des huiles essentielles

II. Les huiles essentielles	08
II.1. Définition	08
II.2. Composition chimique	09
II.3. Propriétés physico-chimiques des HE	10
II.3.1. Caractéristiques physiques	10
II.3.2. Les caractéristiques chimiques	11
II.4. Activité biologique des huiles essentielles	11
II.4.1. Activité antioxydante	11
II.4.2. Activité antibactérienne	11
II.4.3. Activité antifongique	11
II.5. Les principales méthodes d'extraction	12
II.5.1. Extraction par hydrodistillation	12
II.6. Répartition	12
II.7. Localisation	12

CHAPITRE II:

Materiel et methode

I. Objectif	14
II. Matériel	14
II.1. Matériel vegetal	14
II.2. Les souches bactériennes	14
II.3. Matériel et produits de laboratoire	15
II.4. Protocole d'extraction	15
II.4.1. Préparation des échantillons pour l'extraction	15
II.4.2. Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation	16

II.4.3. Détermination des rendements en huiles essentielles	18
II.5. Procédés d'étude microbiologique	18
II.5.1. Souches microbiennes testées	18
II.5.2. Milieux de culture utilisés	18
II.5.3. Préparation des disques	18
II.5.4. Préparation de la suspension bactérienne (L'inoculum)	18
II.6. Etude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles	21
II.6.1. Aromatogramme	19
II.6.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	20

CHAPITRE III:

Resultat et discussion

III. Rendement des huiles essentielles (HE)	25
III.1. L'effet des huiles essentielles	25
III.2. Activité antibactérienne et mécanismes d'action des HE	26
III.2.1. Sensibilité des bactéries à l'huile essentielle de sauge	26
III.3. Discussion	29
Conclusion	31
Références bibliographique	
Annexe	

Résumé

Résumé

Actuellement les huiles essentielles commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives. Elles font l'objet d'étude pour leur éventuelle utilisation comme alternative pour le traitement des maladies et bien que d'autres propriétés biologiques importantes. Le but de ce modeste travail est de déterminer l'activité antibactérienne des huiles essentielles (*Salvia officinalis*) sur trois souches bactériennes pathogènes *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*, ça a été démontré par la méthode de hydrodistillation

Notre objectif est ainsi réalisé par la détermination puis l'étude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Salvia officinalis* vis-à-vis de trois bactérie à Gram négatif (-) et Gram positif(+), *Escherichia coli* Et *Pseudomanas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*, selon la méthode de diffusion sur disque. L'huile essentielle du la sauge possède une forte activité antibactérienne représentée avec des diamètres d'inhibition variant entre 11 mm à 16 mm contre *Staphylococcus aureus*, 8 mm à 12 mm pour *Pseudomanas aeruginosa* et 7 mm pour *Escherichia coli*.

Les mots clés:

Salivia officinalis, L'extraction, activité antibactérienne, huiles essentielles (HE), *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomenas aeruginosa*.

Résumé

Abstrat

Currently, essential oils are beginning to have a lot of interest as a source of bioactive natural molecules. They are being studied for their possible use as an alternative for the treatment of diseases and although other important biological properties. The purpose of this modest work is to determine the antibacterial activity Essential oils (*Salvia officinalis*) on three pathogenic bacterial strains *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*, this has been demonstrated by the method of hidrodistillation.

Our objective is thus realized by the determination then the study of the antibacterial activity of the essential oil of *Salvia officinalis* vis-à-vis three Gram-negative bacteria (-) and Gram-positive bacteria (+), *Escherichia coli* And *Pseudomanas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*, according to the disk diffusion method, according to the disk diffusion method. The essential oil of (Sage) has a strong antibacterial activity represented with diameters of inhibition ranging between 11 mm to 16 mm against *Staphylococcus aureus*, 8 mm to 12 mm for *Pseudomanas aeroginosa* and 7 mm for *Escherichia coli*.

Keywords:

Salivia officinalis, Extraction, antibacterial activity, Essential oils (HE), *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.

الملخص

بدأت الزيوت الأساسية حاليًا تحظى باهتمام كبير كمصدر محتمل للجزيئات الطبيعية النشطة بيولوجيًا. يتم دراستها لاستخدامها المحتمل كبديل لعلاج الأمراض وعلى الرغم من الخصائص البيولوجية الهامة الأخرى. الغرض من هذا العمل المتواضع هو تحديد النشاط المضاد للبكتيريا في الزيوت العطرية (*Salvia officinalis*) على ثلاث سلالات من بكتيريا *Staphylococcus aureus* الجرثومية و *Pseudomonas aeruginosa* و *Escherichia coli* ، وقد ثبت ذلك من خلال طريقة التعرية وبالتالي ، يتم تحقيق هدفنا من خلال تحديد ثم دراسة النشاط المضاد للبكتيريا للزيوت العطرية لسالفيا أوفيسيناليس في مواجهة ثلاث بكتيريا سالبة الجرام (-) وغرام إيجابي (+) وإيشيريشيا كولي وسودوماناس الزنجارية والمكورات العنقودية الذهبية ، وفقا لطريقة نشر القرص. يحتوي الزيت العطري الحكيم على نشاط مضاد للجراثيم قوي بأقطار تثبيط تتراوح ما بين 11 ملم إلى 16 ملم ضد المكورات العنقودية الذهبية ، من 8 ملم إلى 12 ملم لـ *Escherichia coli* و 7 ملم لـ *Pseudomonas aeruginosa*

الكلمات الرئيسية

Salvia officinalis ، استخراج ، نشاط مضاد للجراثيم ، زيوت أساسية (HE)، المكورات العنقودية الذهبية ، الإشريكية القولونية ، الزائفة الزنجارية.

Liste des figures

<i>N °de</i>	<i>Liste des figures</i>	<i>Page</i>
1	La sauge (<i>Salvia officinalis</i> L.)	03
2	Répartition géographique du genre <i>Salvia</i> dans le monde (Walker et al., 2004).	04
3	Feuilles sèches de la sauge	16
4	Dispositif d'extraction de l'huile essentielle « entrainement à la vapeur ».	17
5	Huile essentielle de la sauge	17
6	préparation de l'inoculum	19
7	Dépôt des disques sur la surface des boites ensemencées.	20
8	Determination de la CMI	21
9	Etapas de réalisation du test de l'activité antibactérienne	22
10	les étapes de traitement microbiologique	23
11	Aspect des zones d'inhibition de la croissance microbienne en présence du l'HE protéique par la méthode de diffusion en disque	26
12	Aspect des zones d'inhibition de la croissance microbienne en présence du l'HE diluée à 1/10 par la méthode de diffusion en disque.	26
13	Aspect des zones d'inhibition de la croissance microbienne en présence du l'HE diluée à 1/20 par la méthode de diffusion en disque.	26
14	Aspect des zones d'inhibition de la croissance microbienne en présence du l'HE diluée à 1/40 par la méthode de diffusion en disque.	27
15	Histogramme de comparaison des zones d'inhibition.	29

Liste des Tableaux

<i>N°de Tableaux</i>	<i>Liste des tableaux</i>	<i>Page</i>
1	Composition de l'huile essentielle de <i>Salvia officinalis</i> (Wolter, 2007)	06
2	résumé des principales familles biochimiques, leurs propriétés pharmacologiques dans lesquelles elles sont présentes	09
3	Présentation de la plante employée pour l'extraction d'huile essentielle	14
4	Liste des souches microbiennes testées.	15
5	Matériel et produits de laboratoire	15
6	Transcription des diamètres d'inhibition des disques imprégnés	20
7	Activité antibactérienne de l'huile essentielle de plante étudiée	25

Liste des abréviations

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CPG: chromatographie en phase gazeuse

DMSO: Diméthyl sulfoxyde

HE: Huile essentielle

h : Heure

H₂SO₄ : Acide Sulfurique

Kg: kilo gramme

L: Litres.

LB: milieu Luria-Bertani

M: Molarité

MH: Mueller Hinton

Min: Minute

mg: Milligramme

mg /ml: Milligramme/ Millilitre

ml: Millilitre

mm: millimètre

OH : Groupe hydroxyle

P: poids d'huile essentielle.

PH: Potentiel d'hydrogène

P0: poids sec de la matière végétale

RD: Rendement en huile essentielle

SM: spectrométrie de masse

V: Volume

C⁰: Degré Celsius.

%: Pourcentage

µg : Microgramme

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 (**Erlor 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, p-cymène, a et P- pinène (**Pellecuer et al., 1980**).

Ce travail a pour objet l'extraction et l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'une espèce appartenant à une famille botanique; la famille des Lamiaceae représentée par l'espèce *Salvia officinalis*

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 des plantes étudiées et propriétés des composés majoritaires. La seconde 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.

Etude
Bibliographique

CHAPITRE I

Partie II : Généralités Sur

Salvia officinalis

I. Généralités sur *Salvia officinalis*

I- 1. Description botanique et répartition géographique

Il y a plusieurs centaines d'espèces de sauge dans le monde (environ 900 espèces); en Europe c'est la sauge officinale (ou grande sauge) qui est la plus utilisée comme plante médicinale (**Walker et al., 2004**).

La sauge officinale est une plante commune dans les pays du pourtour méditerranéen, elle affectionne les lieux ensoleillés, on la cultive par semis au printemps. Les plantes sont remplacées tous les 3 ou 4 ans et les feuilles sont récoltées en été.

La sauge est une plante très ramifiée, aux tiges de section carrée, à la base lignifiée mesure de 20 à 30 centimètres. La racine de la sauge est brunâtre et fibreuse. Les feuilles opposées, elliptiques, inférieures pétiolées, veloutées, oblongues, rugueuses, à bord dentelé réticulées, molles, à dessus blanchâtre, persistent l'hiver grâce au revêtement de poils laineux qui les protège. Les fleurs, bleu-rose lilas, visibles de mai à août, sont grandes, groupées à la base des feuilles supérieures, l'ensemble forme de grands épis. Commune en Europe, plus spécialement dans les régions méridionales, elle est cependant rare à l'état sauvage. Sa hauteur est de 50 à 60 cm (**Maatoug, 1990**).

I-2) La sauge (*Salvia officinalis*)

En 1551, un herboriste anglais observait que la sauge « restaure la chaleur naturelles améliore la mémoire et stimule les sens ». La sauge demeure l'une des plantes médicinales les plus renommées, aux multiples vertus, dont celle de stimuler l'ensemble de l'organisme (**Chevallier, 2007**).

Salvia est une plante annuelle et biennale d'origine méditerranéenne de la famille des labiées (Labiacées) (**Djerroumi et Nacef, 2004**). Il existe environ 900 espèces identifiées dans le monde. En Algérie les espèces qui ont été déterminées sont dans l'ordre d'une trentaine (**Maksimovic et al., 2007**).

I.3. Historique

Signifie «sauver», «guérir» ; C'est une des plantes sacrées des anciens. Les Romains la récoltaient avec un cérémonial spécial, sans l'intervention d'outils de fer (or, on pense que les sels de fer seraient incompatibles avec la sauge), «en tunique blanche, les pieds nus et bien lavés », après avoir sacrifié au préalable avec du pain et du vin. Ses effets dus à son huile essentielle et la présence d'un œstrogène avait déjà été observé aussi bien par les Romains que les Égyptiens.

Pendant tout le Moyen Âge, elle reste une plante primordiale et entre dans de très nombreuses préparations: Eau d'arquebuse, Eau céleste, Eau impériale, etc.

Ce qui est confirmé par le dicton : «qui a de la sauge dans son jardin, n'a pas besoin de médecin». Les feuilles de sauge séchées sont un condiment employé depuis l'antiquité.

Elle reste utilisée dans la pharmacopée moderne (**Perry et al., 1996; Putievsky et al., 1992**).

I.4. Description morphologique

Cette plante vivace à tige ligneuse à la base, formant un buisson dépassant parfois 80cm, rameaux vert-blanchâtre, feuilles assez grandes, épaisses, vert-blanchâtres, et opposées; fleurs bleu-violacé clair en épis terminaux lâches, disposées par 3 à 6 en verticilles espacés. Calice campanulé à 5 dents longues et corolle bilabée supérieure en casque et lèvre inférieure trilobée; fruits en forme de tétra akènes (**Fig. 1**) (**Madi, 2010**).

I.5. Classification (*Salvia Officinalis*)

Règne : *Plantae*

Sous-règne : *Tracheobionta*

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Magnoliopsida*

Sous-classe : *Asteridae*

Ordre : *Lamiales*

Famille : *Lamiaceae*

Genre : *Salvia*

Nom binominal : *Salvia Officinalis*L., 1753



Figure 1 : la sauge (*Salvia officinalis* L.)

I.6. Habitat

La sauge officinale est originaire du pourtour du bassin méditerranéen. Elle pousse dans les zones tempérées; son habitat type se situe dans les pelouses basophiles méso-méditerranéennes, méso-xérophiles.

Aire de répartition: introduite d'Asie occidentale (**Alloun, 2013**). Les espèces *Salvia* représentent un groupe d'espèces cosmopolites, qui montrent une gamme remarquable de variation (**Pistelli, 2006**). Ce genre est distribué dans trois régions principales dans le monde: 530 espèces à l'Amérique centrale et latine, 250 espèces en Asie centrale et en régions méditerranéennes, 30 en Afrique du Sud et 90 espèces en Asie de l'Est (**fig. 2**) (**Walker et al., 2004**).

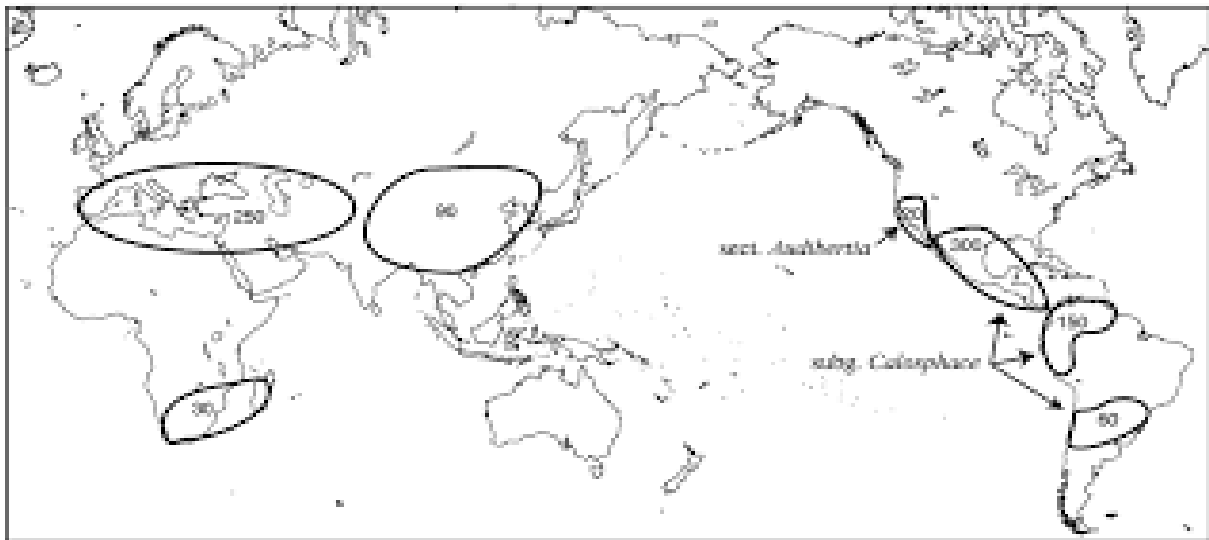


Figure 2 : Répartition géographique du genre *Salvia* dans le monde (Walker *et al.*, 2004).

I.7. Composition de la sauge

I.7.1. Parties utilisées

En phytothérapie, les parties utilisées de la sauge sont les feuilles.

I.7.2. Principaux constituants de *Salvia Officinalis*

- Huile essentielle ;
- Composés phénoliques dont l'acide rosmarinique ;
- Tanins et flavonoïdes ;
- Riche en œstrogènes (hormones féminines) ;
- *Salvène* (Teuscher *et al.*, 2005).

I.7.3. Composition chimique de l'huile essentielle de la sauge

Plusieurs travaux récents ont étudié la composition chimique de l'huile essentielle de *Salvia officinalis* dans différentes régions de part et d'autre du bassin méditerranéen , Plusieurs travaux récents ont étudié la composition chimique de l'huile essentielle de *Salvia officinalis* dans différentes régions de part et d'autre du bassin méditerranéen tel que, la Yougoslavie (Perry *et al.*, 1996 ; Putievsky *et al.*, 1992), la Bulgarie (Tsankova *et al.*, 1994), l'Italie (Place *et al.*, 1995; Piccaglia *et al.*, 1993), l'Égypte (Karawya *et al.*, 1981) et le Maroc (Belkamel *et al.*, 1990),... etc.

La composition chimique de l'huile essentielle de la sauge a été déterminée par la méthode chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG / SM)

Tableau 01 : Composition de l'huile essentielle de *Salvia officinalis* (Wolter, 2007).

hydrocarbures terpéniques		Cétones	
Myrcène	0,3 à 3%	Camphre	4,1 à 27,5%
Limonène	trace à 7,6%	a-thujone	1,5 à 44,2%
Humulène	trace à 18,9%	P-thujone	1 à 36,7%
a-pinène	1,7 à 13,1%	Ester	
P-pinène	0,5 à 17,9%	Acetate de bornyl	0,1 à 3,5%
Camphène	1,1 à 10,3%	Alcools	
P-caryophyllène	trace à 9,4%	Linalol	trace à 1,8%
p-cymène	trace à 1,1%	Bornéol	0,7 à 6,2%
		Viridiflorol	0 à 9,9%
		Autres	
		1,8- cinéole	0,7 à 20,8%

I.8. Principaux usages traditionnelle de la sauge

I.8.1. Usages pharmaceutiques:

Les sauges ont été employées comme des plantes à propriétés médicinales salutaires pendant des milléniums (Radulescu *et al.*, 2004).

La sauge était un composant fréquent des mélanges de tisanes, recommandés pour les patients tuberculeux (Duling *et al.*, 2007).

L'huile essentielle de la sauge est encore utilisée en condiments d'assaisonnement, viandes traitées et liqueurs. Outre ces utilisations, les feuilles de la sauge (*S. officinalis*), montrent une gamme des activités biologiques; antibactérienne, antifongique, antivirale et astringente (Djerroumi et Nacef, 2004).

I.8.2. Usages cosmétologiques

Les espèces *Salvia* ont un grand intérêt en cosmétologie, dont les extraits de *S. officinalis* et *S. lavandula efolia* sont largement introduits dans les produits de beauté et les parfums. La sauge est peut être utilisée comme compresse ou infusion ou même dans les préparations des masques de visage et leurs crèmes sont souvent appliquées sur des blessures froides près de

bouches (**Radulescu et al., 2004**).

I.8.3. Usages alimentaires

Au Mexique et en Amérique latine, les graines de quelques espèces de sauge sont intensivement employées par les Américains indigènes comme source de nourriture et aussi pour préparer ses boissons. La découverte des antioxydants a augmenté l'usage des extraits de sauge officinale connue par son activité antioxydant élevée. La Sauge officinale est riche en huiles essentielles que l'on extrait par distillation, vu ses propriétés importantes, elle est l'une des plantes les plus utilisées (**Radulescu et al, 2004**).

I.9. La toxicologie

Généralement, il n'y a pas de rapports sur les effets secondaires négatifs associés à *Salvia officinalis* L. Malgré leur utilisation pendant de nombreux siècles. L'utilisation normale de la sauge est très sûre ; cependant, il pourrait y avoir un effet négatif sur l'utilisation de *S.officinalis* en quantité excessive, ce qui peut être causé par le contenu élevé de la thuyone (**Hamidpour et Shahlari, 2014**).

L'huile essentielle (HE) de *Salvia officinalis* peut contenir jusqu'à 50% de thuyone qui peut se révéler épiléptisante et neurotoxique. Néanmoins, aucune toxicité aigüe ou chronique n'a été signalée après emploi aux doses usuelles des feuilles de sauge et de son huile essentielle (jusqu'à 15 gouttes par jour).

Cependant, la thuyone provoque non seulement un effet local irritant, mais également des effets centraux psycho mimétiques, après sa résorption. Une consommation chronique de

thuyone peut ainsi conduire à des troubles irréversibles du système nerveux central, à des perturbations des fonctions hépatiques, rénal et cardiaques.

Dans la mesure où la quantité de drogue employée à des fins culinaires reste faible, pour les consommateurs. Une toxicité aigüe après administration d'une forte dose d'HE (2 g et plus). Ainsi, la consommation régulière de sauge, même sous forme de tisane ne parait pas recommandée (**Teuscher et al., 2005**).

I.10. Propriétés thérapeutiques de *Salvia officinalis*

Le nom scientifique de la sauge indique clairement l'importance de son rôle en phytothérapie: *Salvia* vient de *salvare* qui, en latin, signifie «guérir». Sa saveur est chaude,

amère et astringente, elle agit contre les maux de gorge, les troubles de la digestion, elle est stimulante, tonique et stomachique. La sauge possède aussi à divers degrés des propriétés antispasmodiques, fébrifuges, antisudorales et emménagogues (action bénéfique sur les menstruations) (**Duke et al., 2002**).

L'huile essentielle de la sauge officinale est neurotoxique, pouvant provoquer des crises nerveuses rappelant l'épilepsie, ainsi que des vomissements. Le thujone et le camphre en sont responsables. Elle est par ailleurs bactéricide et elle est à éviter lors de la grossesse (risque de fausse couche) ou de l'allaitement (**Jean-Michel, 2012**).

Chapitre I :
Partie II: *Les huiles*
essentiels

II. Définition des huiles essentielles

II.1. Définition

Les huiles essentielles (essences = huiles volatiles) sont "des produits de composition généralement assez complexe renfermant les principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation" (**Bruncton, 1993**).

Les huiles essentielles sont des mélanges naturels complexes de métabolites secondaires volatils, isolés par hydrodistillation ou par expression mécanique.

Elles sont obtenues à partir de feuilles, de graines, de bourgeons, de fleurs de brindilles, d'écorces, de bois, de racines, de tiges ou de fruits mais également à partir de gommages qui s'écoulent du tronc des arbres. Les huiles essentielles sont obtenues par hydrodistillation, expression à froid, comme les agrumes. De nouvelles techniques permettant d'augmenter le rendement de production, ont été développées, comme l'extraction au moyen de dioxyde de carbone liquide à basse température et sous haute pression ou l'extraction assistée par ultrasons ou micro-ondes. (**Besombes C, 2008**).

Pour nous, on définit les huiles essentielles par des substances odorantes et volatiles, extraite d'un végétal sous forme liquide. Elle provient d'une sécrétion naturelle de produits volatils élaborée par certains végétaux et contenue dans les cellules de la plante. Selon l'huile désirée, on prendra tout ou partie d'une plante spécifique pour en extraire l'essence aromatique très volatiles, les huiles essentielles ne rancissent pas, sont solubles dans l'huile et dans l'alcool, mais pas dans l'eau. Elles sont caractérisées par leur couleur, leur odeur, leur densité et leur chémotype : familles biochimiques. Chaque huile essentielle possède donc ses caractéristiques, son parfum, ses propriétés. Les Huiles Essentielles se définissent par :

- leur nom latin qui précise l'espèce botanique et évite les confusions.
- la partie ou organe dont est tirée l'huile essentielle : racines, feuilles, fleurs, graines.
- son mode d'obtention : distillation à la vapeur d'eau ou expression.
- le chémotype ou principe actif caractéristique qui donne les effets physiologiques majeurs.

Contrairement à ce qui est généralement admis, une huile essentielle ne contient pas de corps gras comme les huiles végétales obtenues avec des presses comme l'huile de tournesol, l'huile de maïs, l'huile d'amande douce, etc. (**Besombes C, 2008**).

II.2. Composition chimique

Contrairement à ce que son nom laisse supposer, l'huile essentielle pure et naturelle ne contient aucun corps gras. Elle est composée de molécules à squelette carboné.

Les huiles essentielles ne contiennent ni vitamine, ni sels minéraux, mais peuvent modifier leur absorption et leur assimilation par l'organisme.

Les huiles essentielles sont des substances complexes qui contiennent plusieurs centaines de composants, cependant on peut les regrouper en familles de substances chimiques. Ce sont ces molécules connues et chimiquement définies qui confèrent aux huiles essentielles leurs propriétés thérapeutiques. (Franchomme *et al.*, 2001).

Tableau 02: résumé des principales familles biochimiques, leurs propriétés pharmacologiques dans lesquelles elles sont présentes.

Principales familles Biochimiques de molécules aromatiques	Propriétés thérapeutiques	Toxicité
Acides (Acide salicylique, myrténique...)	Puissants anti-inflammatoires Antalgiques	Pas de toxicité à dose physiologique
Aldéhydes terpéniques (Citronnellal, géraniol, néral...)	Anti-inflammatoires Sédatives	Irritation cutanée
Coumarines (Citroptène...)	Anticoagulantes (efficace même à l'état de trace) Hypotensives Sédatives, hypnotiques	Photosensibilisantes
Esters (Acétate d'eugényle, acétate de linalyle...)	Puissants antispasmodiques Anti-inflammatoires Antalgiques Fongicides Calmantes, relaxantes, sédatives	Pas de toxicité à dose thérapeutique
Ethers (carvacrol méthyl éther...)	Puissants antispasmodiques Relaxantes (plus puissantes que les esters) Antihistaminiques Antalgiques Antivirales	Attention aux Cis-anéthole et α -asarone neurotoxiques et abortives
Cétones (thujone, menthone...)	Mucolytiques Expectorantes Cicatrisantes Antiparasitaires	Neurotoxiques abortives Attention à la toxicité en fonction de la dose
Monoterpènes (camphène, limonène...)	Puissants décongestionnants respiratoires Antiseptiques	Dermocaustiques Attention au genévrier qui peut

	Cicatrisantes (restructuration du tissu conjonctif, emploi de courte durée sur la peau et les muqueuses si utilisé pur)	provoquer une inflammation chez les patients souffrant d'insuffisance Rénale
Monoterpénols (famille des alcools) (linalol, géraniol...)	Immunostimulantes Puissants Antibactériens Virucides Fongicides	Pas de toxicité à dose physiologique
Oxydes terpéniques (linaloloxyle, 1,8 cinéole...)	Expectorantes Décongestionnantes Mucolytiques Antibactériennes Antivirales Antiparasitaires	Pas de toxicité sauf l'ascaridole et menthofurane (hépatotoxique et neurotoxique)
Phénols (famille des alcools) (thymol, carvacrol, eugénol...)	Puissants antibactériens Antivirales Antifongiques Antiparasitaires Immunostimulantes	Dermocaustiques à l'état pur Hépatotoxiques
Sesquiterpènes (cadinène, sélénène...)	Anti-inflammatoires Sédatives Antiallergiques	Pas de toxicité à dose physiologique

II.3. Propriétés physico-chimiques des HE

On trouve généralement les HE incolores ou jaune pâle à l'état liquide à température ordinaire, toutes les HE sont volatiles, odorantes et inflammables. Leur densité est le plus souvent inférieure à 1, seules trois HE officinales ont une densité supérieure à celle de l'eau, ce sont les HE de cannelle, de girofle et de saffras. Elles sont peu solubles dans l'eau, solubles dans les alcools et dans la plupart des solvants organiques, elles sont altérables et très sensibles à l'oxydation. (Jacques G et Paltz, 1997).

II.3.1. Caractéristique physiques

Les huiles essentielles ont aussi des propriétés physiques communes, elles ne sont pas solubles dans l'eau mais en revanche elles le sont dans les solvants organiques et huiles végétales, par contre elles ont des caractéristiques différentes :

- Détermination des rendements en huiles essentielles.
- Densité.

-Un indice de réfraction: L'indice de réfraction (changement de direction de la lumière au passage d'un milieu à un autre).

- Mesure de pH.

II.3.2. Les caractéristiques chimiques

La cellule végétale est le siège de la biosynthèse des composés fondamentaux de la matière vivante que sont les protéines, les lipides, les sucres..., elle est capable de coordonner les multiples réactions enzymatiques conduisant à la production d'huiles essentielles, certaines cellules prennent en charge ces biosynthèses et également le stockage des métabolites formés. Il s'agit là de tout un ensemble de réactions biochimiques participant à la vie des plantes : respiration, photosynthèse.... etc (**Richard, 1992**).

II.4. Activité biologique des huiles essentielles

Les plantes aromatiques possèdent plusieurs activités biologiques, parmi lesquelles on peut citer les activités fongicide, insecticide, herbicide, bactéricide, ...etc.

Les huiles essentielles sont connues pour être douées de propriétés antiseptiques et antimicrobiennes, beaucoup d'entre elles, ont des propriétés antitoxiques, antivénéneuses, antivirales, antioxydantes, et antiparasitaires, plus récemment, on leur reconnaît également des propriétés anticancéreuses (**Lahlou et al., 2004**).

II.4.1. Activité antioxydante

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

II.4.2. Activité antibactérienne

Du fait de la variabilité des quantités et des profils des composants des HE, il est probable que leur activité antimicrobienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire (**Carson et al., 2002**).

II.4.3. Activité antifongique

Dans le domaine phytosanitaire et agroalimentaire, les huiles essentielles ou leurs composés actifs pourraient également être employés comme agents de protection contre les

champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant la denrée alimentaire (**Lis-Balchin, 2002**).

II.5. Les principales méthodes d'extraction

1. Extraction par hydrodistillation.
2. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau.
3. Hydrodiffusion.
4. Expression à froid.
5. Extraction par solvants.
6. Extraction par les corps gras.
7. Extraction par micro-ondes.

On a utilisé une méthode de hydrodistillation.

II.5.1. Extraction par hydrodistillation

Il s'agit de la méthode la plus simple et de ce faite-là plus 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 l'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 (**Paupardin et al., 1990**).

II.6. Répartition

Les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieures, les genres capables d'élaborer les constituants qui les composent sont répartis dans une cinquantaines de familles dont beaucoup sont des Lamiacées, des Astéracées, des Rutacées, mais aussi des Lauracées ou des Magnoliacées (**Bruneton, 1993**).

II.7. Localisation

Les minuscules gouttelettes des huiles essentielles sont rencontrées dans tous les types d'organes: racines, tiges, bois, écorce, feuille, fruits, etc. Elles sont produites par diverses structures spécialement différenciée, l'huile essentielle est produite et stockée dans des tissus sécréteurs de la plante, ces tissus sont divisés en deux groupes:

*Les poils glandulaires épidermiques rencontrés souvent chez les *Lamiaceae*, les

Geraniaceae et les *Rutaceae*, ils produisent les essences dites superficielles.

Les organes sécréteurs sous cutanés comprenant des cellules et des poches sécrétrices au sein du tissu végétal chez les *Myrtaceae*, les *Aurantiaceae*, ainsi que des canaux sécréteurs chez les *Ombelliferaeae* (**Paupardin et al., 1990**).

CHAPITRE II:
MATERIEL
ET METHODES

I. Objectif

- Extraction de certaines HE de plante de la sauge par l'utilisation de méthodes d'extraction par l'hydrodistillation.
- Recherche de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Salvia officinalis* sur certains germes pathogènes: *E.coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonasa aeruginosa*.
- Notre étude s'inscrit dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales à travers la détermination de l'effet *in vitro* de l'association de l'huile essentielle sur les bactéries.

II. Matériel

Ce travail a été effectué au sein du laboratoire de biochimie 01 et celui de microbiologie à la faculté des Science de Nature et de la vie de l'Université de Mostaganem, il a porté sur l'étude de l'activité antibactérienne de l'extrait des feuilles de la sauge (*Salvia officinalis* L) sur les souches étudiées.

II.1. Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué de feuilles de la sauge (*Salvia officinalis* L) (**fig.1**), notre étude a porté sur une espèce, de plante de la famille de lamiaceae « *Salvia officinalis* », les échantillons de la sauge ont été récoltés pendant la période de la floraison, dans le site de l'Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem au mois de Mars. L'identification est effectuée par un botaniste au laboratoire d'écologie de l'université de Mostaganem.

Tableau 03: Présentation de la plante employée pour l'extraction d'huile essentielle.

Nom botanique	Nom vernaculaire	Famille	Organes utilisés
<i>Salvia officinalis</i>	Arabe: المرمية Français: la sauge	<i>Lamiaceae</i>	Les Feuilles

II.2. Les souches bactériennes

L'étude a été réalisée sur trois souches bactériennes appartenant à la collection ATCC (American Type Culture Collection): *Staphylococcus aureus* (Gram positif), *Pseudomonas aeruginosa* (Gram négatif) et *Escherichia coli* (Gram négatif), qui ont été fournies par le laboratoire de microbiologie appliquée de l'université de Mostaganem (**Tableau 04**).

Nous avons étudié l'activité antimicrobienne de nos huiles essentielles vis-à-vis de deux groupes de micro organismes, qui sont en général des contaminants fréquents provoquant ainsi diverses infections (infections de la peau, infections urinaires, rougeole, allergie.....)

Tableau 04: Liste des souches microbiennes testées.

Souche	Code	Gram	Source
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Négative	Le laboratoire de microbiologie de l'université de Mostaganem
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Positive	
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	négative	

II.3. Matériel et produits de laboratoire

Tableau 05: Matériel et produits de laboratoire

Verreries et appareillages	Milieux de culture	Solvants utilisés
Autoclave	Gélose Muller Hinton	Eau distillée
Bain marie	Bouillon nutritif	Eau physiologique
Rotavapeur		Ethanol
Etuve de 37°C		DMSO
Bac bunzen		
Spectrophotomètre		
Réfrigérateur		
Tubes à essai		
Pipettes pasteur		
Anse à platine		
Boîtes de pétri		
Béchers		
Erlenmeyer		
Papier whatman		
Papier filtre		

II.4. Protocol d'extraction

II.4.1. Préparation des échantillons pour l'extraction

Tous les essais qui suivent ont porté sur le matériel séché à l'air libre, à l'abri de la lumière. Le matériel végétal a été ensuite finement broyé à l'aide d'un moulin électrique. Après leur

récolte, les échantillons ont été triés, les étalé sur du papier aluminium et séchage du matériel végétal a été réalisé dans un espace couvert (à l'abri du soleil) et bien aéré, le matériel végétal était retourné au fur et à mesure de son séchage.

Les feuilles séchées sont ensuite conservées à l'abri de la lumière jusqu'à utilisation (**Fig.3**). La conservation se fait dans des flacons hermétiques au réfrigérateur, toutes ces opérations permettent de pallier à la dégradation de certains constituants et contribuent à l'inhibition de toutes les activités enzymatiques contribuant à leur dénaturation (**Benamar, 2010**).



Figure 3: Feuilles sèches de la sauge (**Originaire, 2019**).

II.4.2. Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation

Les feuilles ont été nettoyées et débarrassées de tous éléments étrangers, placées dans des sacs et transportées au laboratoire, l'extraction de l'huile essentielle des feuilles (*Salvia officinalis* L) a été effectuée à l'aide d'un hydrodistillateur de type Clevenger (**Fig.4**), cela consiste à introduire 1kg de matériel végétal sec dans une cocotte de 2 litres contenant de l'eau distillée (**Duru et al., 2003**). L'ensemble est porté à l'ébullition pendant 1heure à l'aide d'un chauffe-ballon, l'huile essentielle obtenue a été séchée en utilisant le sulfate de sodium anhydre (Na₂S₀₄), puis stockée dans l'obscurité à 4°C (**Gardeli et al., 2008**). La conservation de cette dernière s'est faite à 4°C dans de petits flacons en verre opaque, entourés du papier aluminium et fermés hermétiquement, pour une utilisation ultérieure.

Remarque :

La méthode d'extraction est une opération importante qu'il faut mener avec soin, par ailleurs, la collecte, le séchage, le stockage-tributaires à l'extraction influencent largement sur

le rendement ainsi que la qualité des extraits (**Benjlali, 2005**). La méthode d'extraction et la nature du solvant peuvent influencer l'activité antibactérienne des composés phénoliques des plantes. Selon (**Balansard, 2007**), la date de récolte de la plante a une grande influence sur sa composition chimique et par conséquent sur son activité biologique.



Figure 04: Dispositif d'extraction de l'huile essentielle « entrainement à la vapeur ».



Figure 05: Huile essentielle de la sauge.

II.4.3. Détermination des rendements en huiles essentielles

L'extraction par hydrodistillation des huiles essentielles de plantes étudiées a été menée chaque jour, pour définir la valeur maximale du rendement en fonction du temps de séchage et dans les mêmes conditions du travail, le rendement est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue et la masse du matériel végétal utilisé pour cent, après récupération des huiles essentielles, le rendement est calculé par la formule suivante:

$$Rdt = (m/m_0) \times 100$$

Rdt: rendement en huiles essentielles (en %) pour 100 g de la matière sèche.

m: masse d'huiles essentielles récupérées (g).

m₀ : prise d'essai du matériel végétal (g) (Williams et Lusunzi, 1994).

II.5. Procédés d'étude microbiologique

II.5.1. Souches microbiennes testées

Pour notre étude, nous avons testé la sensibilité des souches microbiennes de référence provenant du laboratoire de microbiologie de l'université de Mostaganem vis-à-vis des agents antimicrobiens standards biologiques (huiles essentielles). Il s'agit de trois souches bactériennes (**tableau 03**).

II.5.2. Milieux de culture utilisés

Les milieux de culture utilisés pour les différents tests microbiologiques sont les suivants: (**annexe n°1**).

*La Gélose Nutritive (GN) pour l'ensemencement des souches bactériennes.

*La gélose Mueller Hinton (MH) pour l'étude de la sensibilité des bactéries vis à vis des HE.

II.5.3. Préparation des disques

Les disques sont préparés à partir du papier wattman N3 de 6 mm de diamètre, ensuite elles sont mises dans un tube à essai, stérilisés à l'autoclave 15 minutes à 120°C, puis stockés à une température ambiante (le tube à essai est hermétiquement fermé) (Zahira et al., 2013).

II.5.4. Préparation de la suspension bactérienne (L'inoculum)

La suspension est préparée à partir d'une culture jeune obtenue sur gélose nutritive de 18 à 24H, quelques colonies des souches cibles ont été prélevées et diluées dans un tube à essai contenant 5 ml d'eau physiologique stérile à 0.9 % et bien homogénéisée, puis incubées à

37°C durant 3 heures (fig.6).



Figure 06: préparation de l'inoculum.

La suspension bactérienne est standardisée à 0.5 McF (McFarland), soit une DO de 0,08 à 0,10 lue à une longueur d'onde de 625 nm.

II.6. Etude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles

II.6.1. Aromatogramme

L'aromatogramme est un test de laboratoire qui permet aux phytothérapeutes d'analyser *in vitro* l'activité antibactérienne des huiles essentielles et de sélectionner plus précisément les huiles essentielles capables de supprimer ou de détruire les germes pathogènes (**Damian et al., 1995**). Dans les aromatogrammes, des milieux solides et liquides sont exploitables, cependant, dans la pratique quotidienne le milieu solide est le plus simple et le plus facilement reproductible (**Pibiri, 2006**).

L'activité antibactérienne des huiles essentielles a été déterminée par la méthode de diffusion en gélose (**Hazzit et al., 2009**). On prépare des boîtes de pétri (90 mm de diamètre) en versant 20 ml de milieu Agar Mueller Hinton (MHA) et on laisse solidifier et sécher pendant 30 minutes à une température ambiante du laboratoire avant leur emploi, entre-temps, la densité des suspensions bactériennes a été ajustée par l'eau physiologique stérile en utilisant un densitomètre pour atteindre la concentration finale de 10^6 UFC/ml (**Mohapatra et al., 2011**). Un volume de suspension microbienne standardisée a été ensemencé par étalement et étendu uniformément sur la gélose (MHA) et laissé sécher pendant 5 min.

- **Ensemencement :** Des boîtes de pétri stériles préalablement coulées, sont ensemencées par étalage à l'aide d'un râteau stérile, l'ensemencement s'effectue de telle sorte à assurer une distribution homogène des bactéries.

Des disques stériles de papier Wattman de 6 mm de diamètre, (stérilisation à 120°C pendant 15 min par autoclavage), contenant 10 µl d'huile essentielle pure, sont déposés à l'aide d'une pince stérile à la surface des boîtesensemencées (trois disques par boîte).

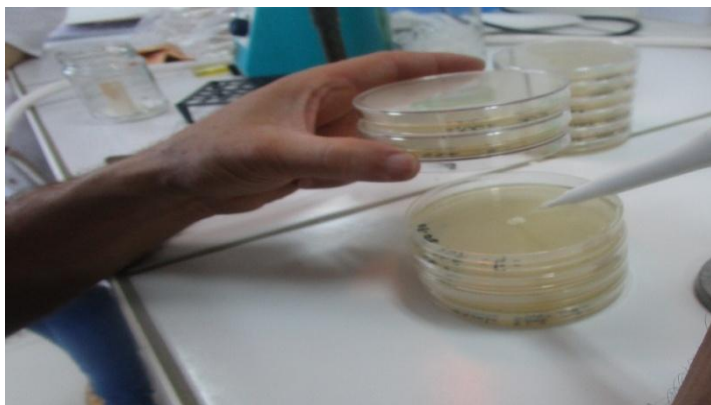


Figure 07: Dépôt des disques sur la surface des boîtesensemencées.

Les boîtes sont ensuite fermées et laissées diffuser pendant 15 min à température ambiante puis incubées à 37 ° C pendant 24 heures, trois essais sont réalisés pour chaque test avec témoins utilisés comme contrôle négatif, les diamètres sont mesurés en mm et le résultat étant la moyenne des trois essais.(**Bekkada, 2019**).

Tableau 06: Transcription des diamètres d'inhibition des disques imprégnés

Diamètres de la zone d'inhibition (mm)	Transcription	Sensibilité du germe
<8	-	Résistant
9 – 14	+	Sensible
15 – 19	++	Très sensible
>20	+++	Extrêmement sensible

II.6.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La CMI est définie comme étant la plus faible concentration en huile essentielle capable d'inhiber la croissance microbienne de 90%. Sa détermination a été réalisée en milieu solide

selon la méthode rapportée par (Remmal *et al.* 1993).

Afin de disperser les composés de l'huile essentielle et d'améliorer leur contact avec les germes à tester, la solution mère de l'huile essentielle est préparée par émulsion à raison de 10% (DMSO).

Des dilutions successives de la solution obtenue sont ensuite effectuées de façon à obtenir les dilutions suivantes: 1/10, 1/20, 1/40 dans la solution de DMSO.

A l'aide d'une pipette pasteur des prises à raison de 1,5 ml de chacune des dilutions d'extrait de *Salvia officinalis* préparé à (10% ,20% et 40%) Trois disques imbibés pendant 5 minutes dans chaque concentration est introduit dans une boîte Pétri contenant 13,5 ml du milieu MH et on fait tourner les boîtes d'un mouvement circulaire jusqu'à l'obtention d'un milieu homogène. La gamme de concentrations finales d'huile essentielle utilisée est de: 1/10, 1/20, 1/40.

À l'aide d'une anse calibrée, un ensemencement des suspensions bactériennes standardisées est effectué en stries (**fig.8**). Les boîtes Pétri ont ensuite portés à incubation à 37°C pendant 24-48H. Des contrôles négatifs ne contenant que le milieu de culture, DMSO et l'inoculum ont été également préparés. Les essais sont effectués en triple pour chacune des concentrations d'huile essentielle utilisées.



Figure 08: Détermination de la CMI.

La lecture des résultats se fait à l'œil nu par observation et la CMI correspond à la plus faible concentration d'huile à laquelle aucune croissance microbienne n'est visible (CLSI, 2006; Oussou *et al.*, 2004).

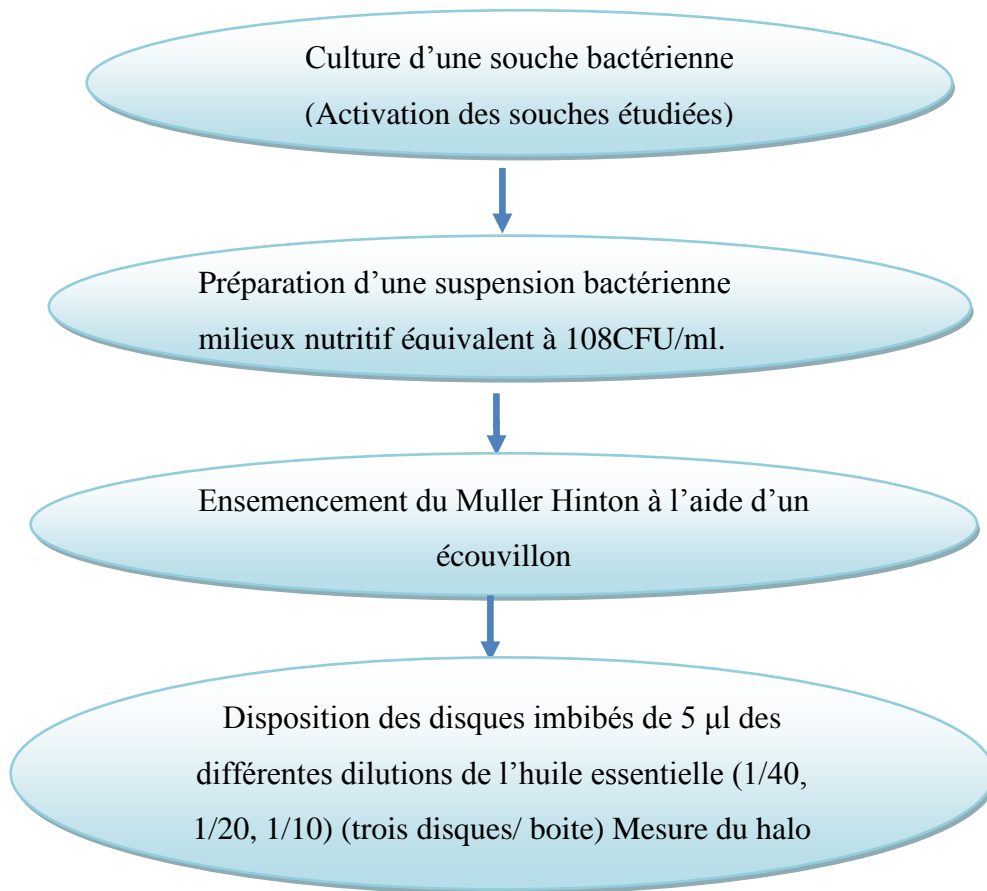


Fig. 9: Etapes de réalisation du test de l'activité antibactérienne

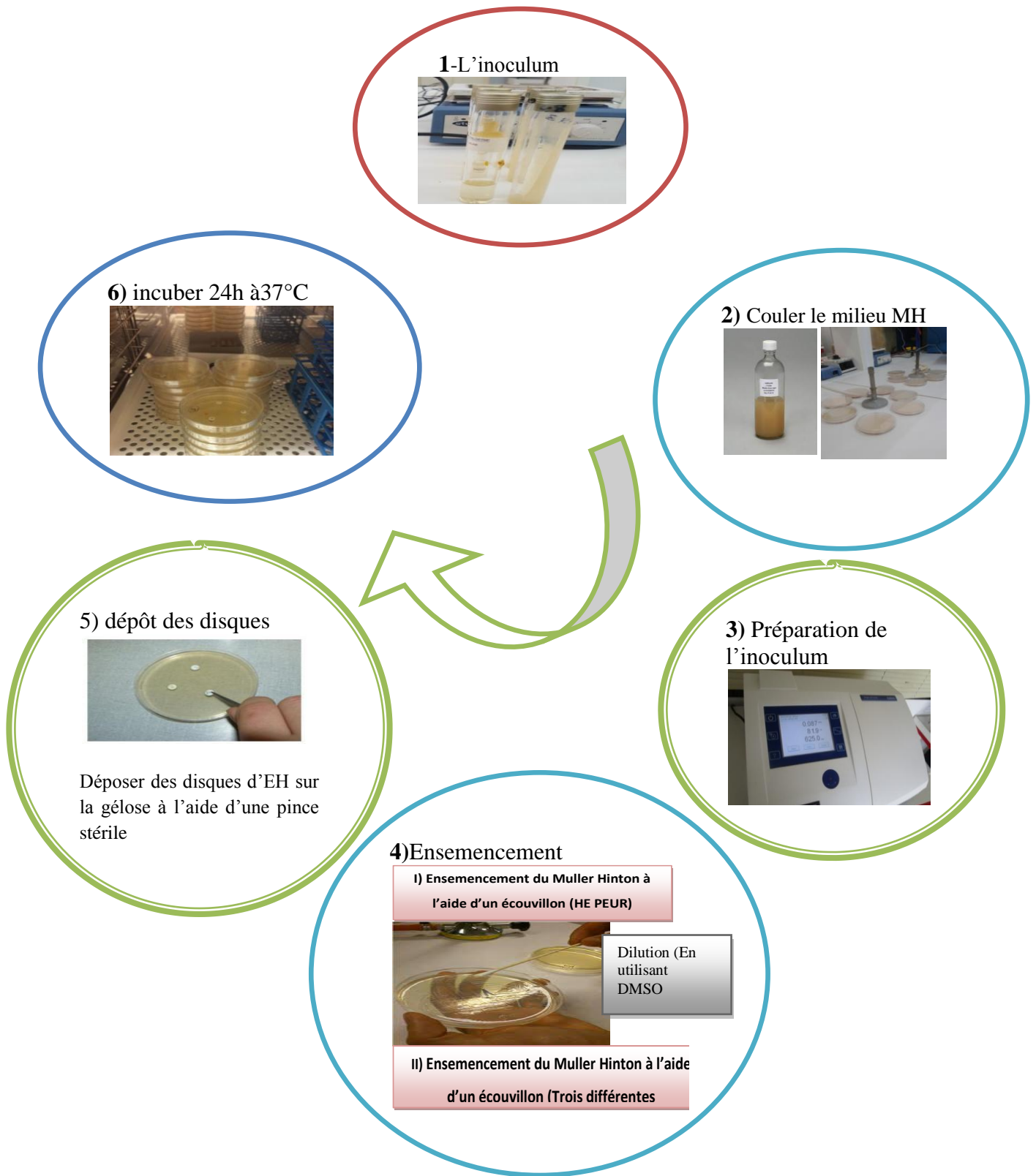


Figure 10: les étapes de traitement microbiologique.

**CHAPITRE III:
RESULTAT ET
DISCUSSION**

III. Rendement des huiles essentielles (HE)

Le rendement moyen en huiles essentielles de la partie aérienne de *Salvia officinalis* L, extraite par entraînement à la vapeur d'eau, calculé en fonction de la masse du matériel végétal traité est de l'ordre de 0.3705%.

Ce rendement est comparable à celui obtenu dans des études similaires. C'est ainsi que **Chalchat et Michet, (1998)**, ont montré que le rendement d'extraction des HE de *Salvia officinalis* obtenue par distillation pendant quatre heures dans un appareil « *Clevenger* » varie en fonction de l'origine de la plante: France (2,05%), Hongrie (2,50%), Portugal (2,90%), Roumanie (2,30%)...etc. Cette variation dans le rendement peut être attribuée non seulement à l'origine de la plante et à la technique d'extraction mais également à la période de prélèvement du matériel végétal

III.1. L'effet des huiles essentielles

La méthode de diffusion des disques nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antimicrobien des HE vis-à-vis des microorganismes. La sensibilité des souches se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour des disques, les zones d'inhibition obtenues, varient entre 7 et 20 mm, indiquant que les souches testées n'ont pas la même sensibilité vis-à-vis de l'HE. Les valeurs indiquées sont les moyennes de trois mesures. Les résultats de l'aromatogramme de l'HE sont regroupés dans le tableau 07.

Tableau 07 : Activité antibactérienne des huiles essentielles de la plante étudiée.

Gram	microorganismes	diamètre d'inhibition (mm)			
		Pure	1/10	1/20	1/40
Gram négatif	<i>Escherichia coli</i>	07	-	-	10
Gram positif	<i>Staphylococcus aureus</i>	20	07	08	15
Gram négatif	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12	10	-	-

D'après le tableau 07, on constate que les HE de *Salvia Officinalis* ont montré une activité antimicrobienne notamment aux fortes concentrations (1/40) sur les souches testées.

Escherichia coli

Staphylococcus aureus

Pseudomonas aeruginosa



Figure 11: Aspect des zones d’inhibition de la croissance microbienne en présence des HE pures par la méthode de diffusion en disque.

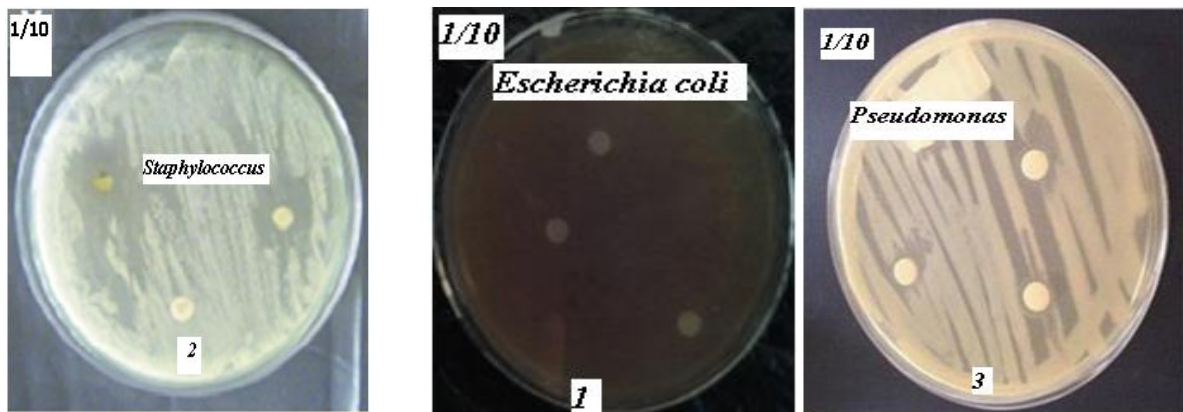


Figure 12: Aspect des zones d’inhibition de la croissance microbienne en présence des HE diluées à 1/10 par la méthode de diffusion en disque.

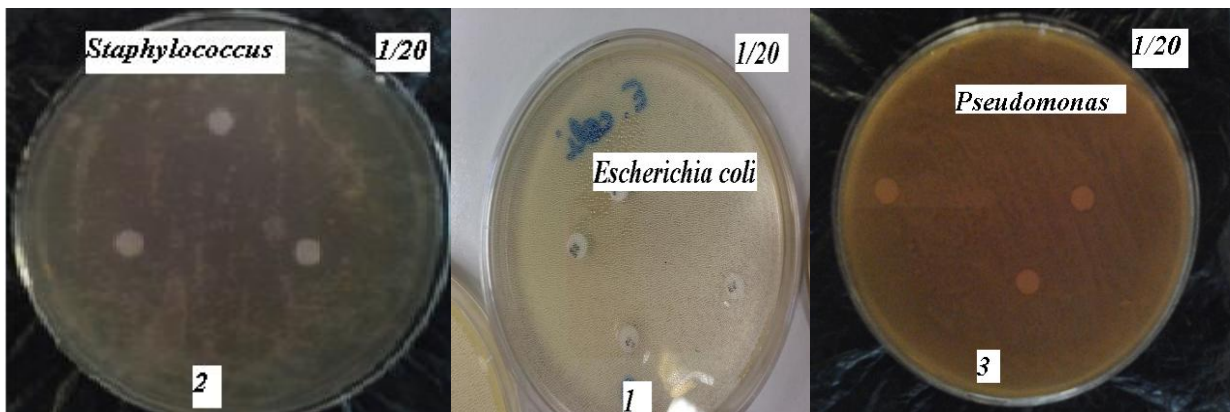


Figure 13: Aspect des zones d’inhibition de la croissance microbienne en présence des HE diluées à 1/20 par la méthode de diffusion en disque.

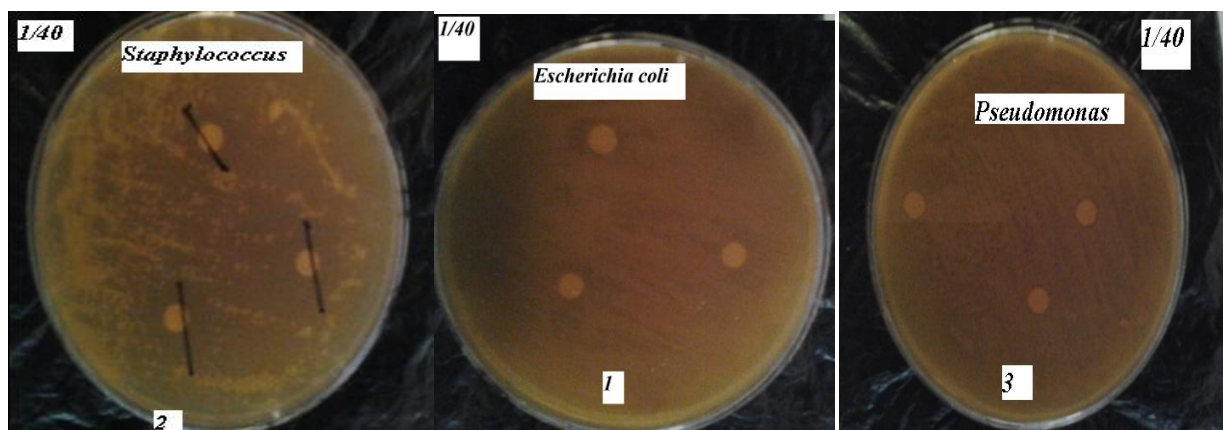


Figure 14: Aspect des zones d'inhibition de la croissance microbienne en présence des HE diluées à 1/40 par la méthode de diffusion en disque.

III.2. Activité antibactérienne et mécanismes d'action des huiles essentielles

III.2.1. Sensibilité des bactéries à l'huile essentielle de sauge

La méthode de diffusion des disques nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien de l'huile essentielle des Feuilles de *Salvia officinalis* vis-à-vis de trois Bactéries. Les zones d'inhibition sont indiquées dans le **tableau 07**. D'après la classification de **Ponce et al., (2003)**, les zones d'inhibition, variant entre 8 et 20 mm, indiquent que les souches testées sont plus ou moins sensibles à l'huile essentielle des Feuilles de *Salvia officinalis*. Les HE ont un effet sur la croissance des bactéries, elles agissent en empêchant leur multiplication et la synthèse de toxines. Par ailleurs, les HE attirent actuellement beaucoup d'attention parce qu'elles ont montré une activité contre les pathogènes résistants aux antibiotiques, tels que les staphylocoques dorés résistants à la méticilline (SARM), les β -Lactamases à spectre élargi (BLSE) et les entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) (**Tohidpour et al., 2010 ; Warnke et al., 2013**).

Compte-tenu de la diversité des molécules présentes dans les HE, l'activité antibactérienne semble résulter d'une combinaison de plusieurs modes d'action, impliquant différentes cibles cellulaires. D'une manière générale, leur action se déroule en trois phases selon (**Calsamiglia et al., 2007 ; Djilani et Dicko, 2012; Goetz et Ghedira, 2012**) :

- Attaque de la paroi bactérienne, ce qui provoque une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires;

- Acidification de l'intérieur de la cellule provoquant la coagulation des constituants cellulaires par la dénaturation des protéines, ce qui bloque la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure ;
- Destruction du matériel génétique, ce cause la mort de la bactérie.

Il est à noter que les plantes contiennent de nombreux composés doués d'une action antimicrobienne, ces constituants comprennent les composés phénoliques, les flavonoïdes, les huiles essentielles et les terpènes (**Rojas et al., 1992**).

A travers les résultats obtenus, on déduit que les souches testées présentent un haut niveau de résistance vis-à-vis des différentes concentrations d'extraits de la plante étudié. Ceci est confirmé par **Bouajaj et al., (2013)** qui ont rapporté que l'huile essentielle de la sauge exerce une faible inhibition vis-à-vis d'*Escherichia coli* avec 07mm de diamètre de zone d'inhibition. En revanche, l'huile essentielle de *S. officinalis* inhibe la croissance des bactéries, des levures et des dermatophytes selon **Jalsenjak et al., (1978)**; **Janssen et al., (1989)**.

Enfin, l'activité antimicrobienne est dépendante des caractères physico-chimiques des

composés phytobiotiques et des souches employées. **Sari et al., (2006)** ont établi la corrélation entre la composition chimique et l'activité antimicrobienne, et ont classé les molécules chimiques selon leur importance du point de vu activités biologiques comme suit: phénols, alcools, aldéhydes, cétones, éther et hydrocarbures.

Les résultats des HE vis-à-vis des différents germes sont présentés dans la (**fig.11**). Les diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne augmentent avec l'augmentation des doses d'huile. Cette activité inhibitrice des huiles sur les trois souches bactériennes est faible celle due aux antibiotiques de références (**Tableau 8**).

La plus grande zone d'inhibition a été observée chez *Staphylococcus aureus* avec une zone de 20 mm de diamètre. La zone la plus faible a été observée chez *Pseudomonas aeruginosa* avec un diamètre de 10 mm, et pas de zones d'inhibition claires chez *Escherichia coli* avec une zone de 07 mm de diamètre.

Les résultats du test d'antibiogramme montrent une variation dans l'efficacité d'inhibition de l'huile essentielle de *salvia officinalis* vis-a-vis des souches bactériennes testées: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.

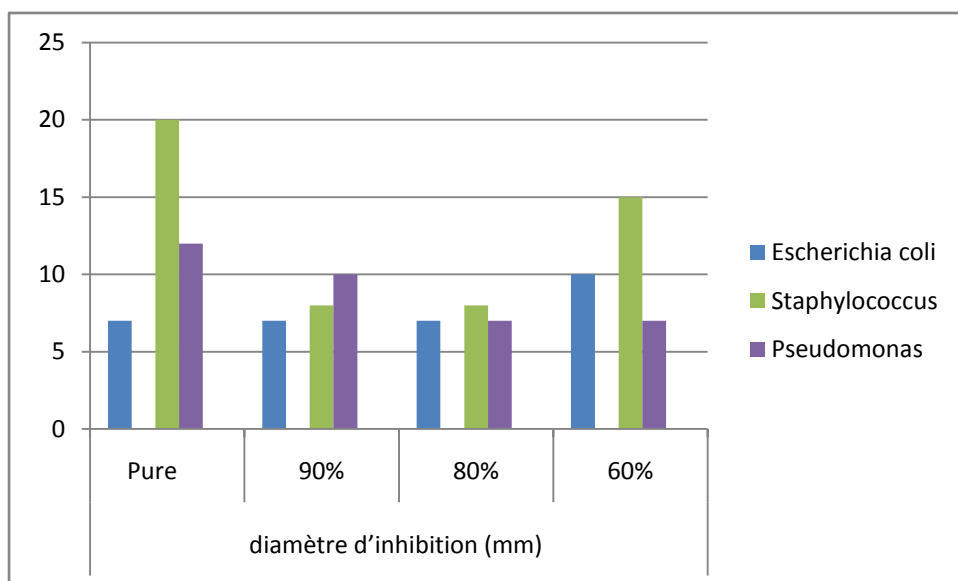


Figure 15: Histogramme de comparaison des zones d'inhibition.

D'après le **tableau 07** et la **figure 15**, nous constatons facilement que l'huile essentielle des feuilles de *Salvia officinalis* n'a pas une très bonne activité si on la compare à l'antibiotique de contrôle. Nous constatons aussi que *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 sont les bactéries les plus sensibles, malgré l'existence des zones d'inhibition, relativement faibles, nos résultats prouvent l'existence d'activité antibactérienne contre les trois souches testés, des microbes pathogènes impliqués dans les intoxications alimentaires.

Les huiles essentielles sont piètrement solubles dans l'eau, ce qui pose beaucoup de problèmes pour étudier leur activité antibactérienne, ceci a été déjà rapporté par **Southwell et al. (1993)** et **Griffin (2000)**.

La méthode des disques est généralement employée comme une analyse préliminaire pour étudier l'activité antibactérienne ensuite viennent des méthodes plus détaillées. Dans cette méthode, les paramètres tels que le volume de l'huile essentielle placé dans les disques, l'épaisseur de la couche d'agar et si un dissolvant est employé varient considérablement entre les études (**Manou et al., 1998; Burt, 2004**). Ceci signifie que cette méthode est utile pour le choix des huiles essentielles actives et pour la mise en évidence de leur activité antibactérienne.

Nous constatons que *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 sont les bactéries les plus sensibles, avec une zone d'inhibition de 20 mm. Ceci pourrait être expliqué par le fait que les bactéries à G+ possèdent des dispositifs structuraux qui sont plus susceptibles aux huiles essentielles (**Abdul Rahman et al., 2010**). En revanche, *Pseudomonas* est moins sensible.

Dans la présente étude, les bactéries à Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853)

sont avérées résistantes, elles montrent une zone d'inhibition de 12mm. Plus leurs travaux notamment ceux de **Hammer et al. (1999); (2002); Souza et al.(2006a); Derwich et al. (2010) et Bari et al. (2010).**

Conclusion

Conclusion

Conclusion

Un grand nombre de plantes aromatiques contiennent des composés chimiques dotés de propriétés biologiques différentes. De nombreuses recherches ont porté sur les huiles essentielles extraites de ces plantes aromatiques. Parallèlement, les recherches sur les propriétés antioxydants, antibactériennes et fongicides chez certaines plantes sont rares. Par conséquent, l'évaluation de ces caractéristiques reste une tâche intéressante et utile, en particulier pour trouver de nouvelles sources d'agents antimicrobiens naturels, dans ce contexte, nous avons essayé d'évaluer les activités antibactériennes in vitro des huiles essentielles extraites des feuilles de *Salvia officinalis*.

Les huiles essentielles ont été extraites par hydro distillation. Le rendement était proche de 0,3705%.

L'évaluation de l'activité antibactérienne nous a permis de mettre en évidence l'effet antibactérien de l'huile essentielle de feuilles de *Salvia officinalis* vis-à-vis de trois bactéries ou les zones d'inhibition étaient comprises entre 8 et 20 mm.

Enfin, nos résultats indiquent que les huiles essentielles de feuilles de *Salvia officinalis* ont exercé une activité antibactérienne variable selon les espèces testées.

En perspective, il sera intéressant de mener une étude plus approfondie sur les huiles essentielles de feuilles de *Salvia officinalis* afin d'isoler, de purifier et d'identifier les composés ayant une activité antibactérienne.

Références bibliographiques

Références bibliographique

-A-

- Abdul Rahman M.S., Thangaraj S., Salique S.M., Khan K.F. and Natheer S.E., 2010,** Antimicrobial and biochemical analysis of some spices extract against food spoilage pathogens. *Internet Journal of Food Safety*, Vol.12, p. 71-75.
- Archambaud, M., (2009).** Méthodes d "évaluation de l "activité des antibiotiques in vitro. *Laboratoire Bactériologie-Hygiène, CHU Rangueil Toulouse.*

-B-

- Balansard G., (2007)** Analyse critique des protocoles pharmacologiques utilisés pour la recherche d'extraits et de substances pures d'origine végétale à propriétés Antibactérienne ou antiparasitaire. *Revue ethnopharmacologie*.p4
- Bari M.A., Islam W., Khan A.R. and Mandal A., 2010,** Antibacterial and antifungal activity of *Solanum torvum* (Solanaceae), *Int. J. Agric. Biol.*, p. 386-390.
- Belkamel. S., Drouet, M., Rouzet, (1990),** *Rev. Mar. Pharmacol.* 4, 7.
- Benamar H.;Rached W.; Derdour A.; Marouf A.,2010.** Screening of Algerian Medicinal Plants for Acetylcholinesterase Inhibitory Activity. *Journal of Biological Sciences*,Volume: 10 Issue: 1
- Benjlali B. (2005) :** *le matériel végétal et l'extraction. In : Huiles essentielles, de la plante à l'extraction.* Manuel pratique. Edition université de Québec à Chicoutimi, p 61-78.
- Bekkada A. (2019):** Professeur à l'université de Tissemsilt
- Besombes C.,** Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro thermomécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées, Thèse de doctorat, Université de La Rochelle, 2008, p.289.
- Burt S., 2004,** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review, *International Journal of Food Microbiology*, p.223-253.
- Bouajaj S.,Benyamna A., Bouamama H., Romane A., Falconieri D., Piras A. & Marongiu B. (2013):** Antibacterial, allelopathic and antioxidant activities of essential oil of *Salvia officinalis* L. growing wild in the Atlas Mountains of Morocco. *Natural Product Research*, **27(18)**: 1673–1676.

Références bibliographique

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.

Bouzouita, N., Kachouri, F., Ben halima, M., et Chaabouni M., (2008), Composition chimique et activité antioxydante, antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea*, *J. Soc. Chim. Tunis.* 10, 119-125.

Bourrel C. ; (1993).Analyse chimique, activités biostatiques et antioxydantes d'extraits de plantes aromatiques sélectionnées. Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Biochimie. Institut National Polytechnique de Toulouse. France.

Bruneton, J. (1993) : Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales. 2ème édition, Lavoisier Techniques & Documentation, Paris7.

-C-

Cattoir, D V, (2006). < Bacterio 15. pdf >etude in vitro de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques. *Cours de DCEM1 - Faculté de Médecine de Créteil.*

Chalchat, A., Michet, B., Pasquier, (1998). *Flavour Fragr J.* 13, 68.

Chaumont J. P., Leger D. ; (1989).Propriétés antifongiques de quelques phénols et de composés chimiquement très voisins Relation structure —activité. *Plant Med Phyto.* ; 21 U2 ; 124-126.

Chevrollier A, 2007, Le spécialiste, Les plantes médicinales, Avant propos du Dr ANN WALKER, Éditions Gründ pour l'édition française « GRUND » REMEDES .posologie .preparations .propriétés thérapeutiques. Soins.

CLSI (2006): Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard. Seventh Edition.*CLSI document M7-A7 (ISBN 1-56238-587-9).* **26 (2):** 31 pages.

-D-

Références bibliographique

Derwich E., Benziane Z. et Boukir A., 2010, GC/MS Analysis and antibacterial activity of the essential oil of *Mentha pulegium* grown in Morocco. *Res. J. Agric. & Biol. Sci.*, p :191-198.

Djerroumi A &Nacef M. (2004) :*100 plantes médicinales d'Algérie*. Edition Palais du livre P135-131.

Duke J A., Bogenschutz-godwin du cellier M J., et Duke P A K., (2002). *Medicinal Herbs*. Edition CRC Press LLC.P:201.

Duling E.N., Owen J.C., Joh B.G., Rosmaru F.W., Kevin A.M., Yeap L.F & Nigel B.P. (2007): Extraction of phenolic and essential oil from dried sage (*salvia officinalis*) using ethanol-water mixture. *Food chemistry*, **101**:1417-1424.

-E-

Erler, F., Ulug I., and Yalcinkaya B., (2006). Repellent activity of five essential oils against *Culex pipiens*, *Fitoterapia*, **77**, 491-494.

-F-

Fellah S., Romdhane M &Abderraba M. (2006) : Extraction Et Etude Des Huiles Essentielles De *La Salvia Officinalis*. L Cueillie Dans Deux RegionsDifferentes De La Tunisie, *Journal de la Société Algérienne de Chimie*, **16 :2** , 193-202.

Franchomme P, Jollois R, Pénéol D. L'aromathérapie exactement : encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles : fondements, démonstration, illustration et applications d'une science médicale naturelle. Rger Jollois. Limoges: R. Jollois; 2001.

-G-

Gachkar L., Yadegari D., Rezaei M.B., Taghizadeh M., Astaneh S.A. et Rasooli I., 2007, Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils, *Food Chem.*, p: 898-904

Griffin S., 2000, Aspects of antimicrobial activity of terpenoids and the relationship to their molecular structure, Doctorante thesis, University of Western Sydney, Sydney, Australia.

Références bibliographique

Ghedira K., Goetz P., Le Jeune R. (2010) Syzygium aromaticum (L.) Merr. & Perry (Myrtaceae) Giroflier, Phytothérapie, 8, 37-43.

-H-

Hammer K. A., Carson C. F. et Riley T. V., 1999, Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts, *Journal of Applied Microbiology* Vol. 86, Issue 6, p.985-990.

Hamidpour, M. R. S., Shahlari, M. 2014 - Chemistry, Pharmacology, and Medicinal Property of Sage (*Salvia*) to Prevent and Cure Illnesses such as Obesity, Diabetes, Depression, Dementia, Lupus, Autism, Heart Disease, and Cancer. Vol.4, N°, pp.82– 88.

Hazzit M., Baalioumer A., Verissimo A. R., Faleiro M. L. & Miguel M. G. (2009).Chemical composition and biological activities of Algerian Thymus oils.*Food chemistry*,**116**: 741-721.

Hurry, G., Hayashi, M et Maguire, J.-J. 2009. Rapport de l'évaluation indépendante des performances de l'ICCAT.

-J-

Jacques G. Paltz s.a.- Le fascinant pouvoir des huiles essentielles. Fascicule du laboratoire "Jacque Paltz". 1997.

Jalsenjak V., Peljnjak S. Kustrak, D.(1987) :Pharmazie, 42, 419-420 Juin, H, 2005.In: 6èmeJRA 2005.

Janssen A.M., Scheffer J.J., Parhan-van Atten A.W &BaerheimSvendsen A. (1989): Screening of some essential oils for their activities on dermatophytes. *Pharm. Weekbl. Sci.* **10**: 277–280.

Jean-Michel, (2012) plantes médicinales et huiles essentielles : phytothérapie, plantes médicinales, aromathérapie, huiles essentielles.

-K-

Karawya, S., El Hawary, (1981). *J. Pharm. Sci.* 19, 301.

Références bibliographique

Keita A.; (1993). Terpènes de l'huile essentielle des inflorescences de « Ce Kala» *Cymbopogon anleus* chiov. *Médecine d'Afrique Noir*; 40(4) ; 423-428.

-L-

Lassoued I., Mora L., Nasri R., Aydi M., Toldrá F., Aristoy M. C., Nasri, M., 2015. Characterization, antioxidative and ACE inhibitory properties of hydrolysates obtained from thornback ray (*Raja clavata*) muscle. *Journal of Proteomics*, 128:458-68. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2015.05.007>.

Lopes-Lutz D., Alviano S.D., Alviano C.S., Kolodziejczyk P.P., 2008. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochemistry*, 69 :1732-1738.

Lis-Balchin M., 2002, Lavender: the genus *Lavandula*, Taylor and Francis, London, p. 37, 40.

-M-

Maatoug, Février (1990). « *Nos plantes médicinales* ». Lexiques cliniques des plantes médicinales non toxiques employées en Tunisie.

Madi Aicha. (2010) : *Caractérisation et comparaison du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales (Thym et Sauge) et la mise en évidence de leurs activités biologiques,*

Mémoire de Magister, Option : Biotechnologie végétale, Université Mentouri Constantine, Faculté des sciences de la nature et de la vie, Département de biologie et écologie.

Maksimovic M., Danijela V., Mladen M., Sabaheta A & Sonja S.Y. (2007): Effet of the environmental condition on essential oil profile in tow dinaric *Salvia* species: *Salvia brachydonvandas* and *salvia officinalis* L. *Biochemical systematics and Ecology*. **35:** 473-478.

Manou I., Bouillard L., Devleeschouwer M.J. and Barel A.O., 1998, Evaluation of the preservative properties of *Thymus vulgaris* essential oil in topically applied formulation sunder a challenge test. *J. Appl. Microbiol.* 84, p. 368-376.

Moleyar V., and Narasimham P., (1986). Antifungal activity of some essential oil components, *Food Microbiology*, 3, 331-336.

Morand, D., (1989). L'intérêt phytothérapeutique de l'arbre à thé (*Melaleuca alternifolia*). *Laboratoire d'écologie végétale - Université de Paris-Sud - 91 Orsay et Jery Nizinski, Institut*

Références bibliographique

Français de Recherche Scientifique pour le développement en coopération avec l'Orstom à paris.

-O-

Oussou, K.R., C. Kanko, N. Guessend, S. Yolou, M. Dosso, Y.T. N'Guessan, G. Figueredo, J.-C. Chalchat, and G. Koukoua, Activités antibactériennes des huiles essentielles de trois plantes aromatiques de Côte-d'Ivoire. *Comptes Rendus Chimie*, 2004.

-P-

Paupardin C., Leddet C., Gautheret R. ; (1990). Genetics, selection and multiplication. Amelioration of *Artemisia* species (*Artemisia ubellformis* and *E. genipi*) by meristem culture. *J. Jap. Bot.* ; 65 ; 33.

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.

Perry, A J., Baxter, N J., Brennan, J W., Van Klin J., (1996). *Flavour Frag.* 11, 213.

Ponce A.G., Fritz R., del Valle C. et 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.

Pibiri M. C. ; (2006). Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles .Thèse présentée à la Faculté Environnement Naturel, Architectural et Construit Institut des Infrastructures, des Ressources et de l'Environnement section d'architecture pour l'obtention du grade de Docteur Es-Sciences. Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne.Suisse.

Piccaglia, M., Marotti J., (1993). *Flavour Frag* 8, 115.

Pistelli L. 2006 - Photochemicals from lamiaceae: from nutraceuticals to Hallucinogens. International symposium The La biatae: Advances in Production, Biotechnology and Utilization, Sanremo, Italy: 22-25 February 2006.

Place, R., Piccaglia, J., essent. (1995). *Oil. Res.* 7, 443.

Putievsky, U., Ravid, D., Sanderovich, J., Essent (1992). *Oil Res.* 4, 291.

Références bibliographique

-R-

Radulescu V., Silvia C & Eliza O. (2004): Capillary gas chromatography-mass spectrometry of volatile and semi volatile compound of salvia *officinalis*. *Journal of chromatography A*, **1027**:121-126.

Remmal A., Bouchikhi T., Rhayour K., Ettayebi M., Tantaoui- Elaraki A., (1993). Improved method for determination of antimicrobial activity of essential oils in agar medium. *J. Ess. Oil Res*, 5(2), 179-184.

Rojas A., Hernandez L., Pereda-Miranda R., Mata R. (1992) Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. *J. Ethnopharmacology*. **35** : 275-283.

Richard H. et Peyron F., 1992, Epices et aromates, Ed .Tec & Doc-Lavoisier, Paris, p. 339.

-S-

Sari M., Biondi D.M., Kandalari G., D'Arrigo M., Bisignano G., Saija A., Daquino C & Ruberto G. (2006): chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of several populations of Algerian *Organum glandulosum* Desf. *Flavor and fragrance Journal*. **21**:890-898.

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

Southwell I.A., Hayes A.J., Markham J. and Leach D.N. 1993, *Acta Horticult.*, p.344,256–265. In **Ahmad I., Aqil F. and Owais M., 2006,** *Modern Phytomedicine: Turning Medicinal Plants into Drugs*, Ed. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, p . 405.

Souza E.L., Guerr N.B., Stamford T.L.M. and Lima E.O., 2006b, Spices: alternative sources of antimicrobial compounds to use in food conservation. *Rev. Bras. Farm.*, p. 22-25.

Skandamis et Nychas, (2001): plantes médicinales et huiles essentielles: plantes médicinales, aromathérapie, huiles essentielles.

-T-

Références bibliographique

Teuscher E., Anton R., et Lobstein A., (2005). Plantes Aromatiques (épices, aromates, condiments et huiles essentielles). Edition Tec et Doc. Paris. Edition. E.M. inter. Allemagne. P : 266.

Tsankova, A N., Konkchiev, E M., Genova, J ., (1994). Essent. Oil. Res, 6, 375.

-U-

Ultee, A M H J., Bennink, and R., Moezelaar, (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. Applied and Environmental Microbiology 68:1561-1568.

-V-

Viollon C., Chaumont J. P. ; (1994). Antifungal properties of essential oils and their main components upon *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia*; 128(3); 151-153.

-W-

Walker, J B., Sytsma, K J., Treutlein, J., Wink, M ., (2004). *Salvia* (*Lamiaceae*) is not monophyletic: implications for the systematics, radiation, and ecological specializations of *Salvia* and tribe Mentheae. *Am. J. Bot.* 91, 1115–1125.

Williams L R., Lusunzi I., (1994). Essential oil from *Melaleuca dissitiflora*: a potential source of high quality tea tree oil. *Industriell Corps and products.* 2; 211-221.

Wolters kluwer, (2007). botanique pharmacognosie phytothérapie.1, rue Eugène et Armand Peugeot. 92500 Rueil-Malmaison Cedex.

-Z-

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.

Zahira et al, (2013): 100 plantes médicinales d'Algérie. Edition Palais du livre P135-131.

Références bibliographique

Annexes

Annexes 1

Au cours de cette étude, les milieux de cultures sont utilisés solides par addition d'agar-agar à raison d'une concentration de 2%(P/V). La composition des milieux des cultures est exprimée en g/l.

✓ **Muller Hinton (MH):**

Poudre déshydratée du MH.....	38g
L'eau distillée.....	1l

Le milieu est solidifié par l'ajout de 2% (P/V) d'agar-agar.

C'est le milieu de culture utilisé pour étudier l'activité antibactérienne parce que c'est le milieu le plus employé pour les tests de sensibilité aux agents antibactériens (**Gachkaretal, 2006**). Ce milieu est préparé selon la méthode suivante: on pèse avec précision une quantité de poudre déshydratée du MH équivalente 38 g dans un ballon en y ajoutant 1000 ml d'eau distillée.

Le mélange de la poudre-eau distillée est chauffé sur plaque chauffante avec agitation à l'aide d'un barreau magnétique pendant 20 min afin d'assurer une bonne dissolution des cristaux. Le milieu MH est ensuite réparti dans des flacons stériles avant d'être autoclave pendant 15 min à 121°C avec une pression de 1 bar.

Annexes 2

➤ Milieu de culture (LB)

Formule* par 1 litre d'eau purifiée

- peptone10 g
- extrait de levure.....5g
- NaCl.....5g
- Agar.....19 g

Le pH ajusté à 7, le milieu est autoclavé à 120°C pendant 20 mn.

➤ Les différents types de bactéries

• **Les bactéries à gram positif:** (*Staphylococcus aureus*)

Les bactéries à Gram + ont une structure unimembranée qui est organisée en trois grandes parties : (de l'extérieur vers l'intérieur) :

- La couche de peptidoglycane composant la paroi cellulaire.
- L'espace périplasmique.
- La membrane plasmique.

-La couche de peptidoglycane est très épaisse. L'espace périplasmique est beaucoup plus étroit que chez les Gram- et c'est un espace de stockage d'enzymes, de nutriments, de protéines, d'ions..., Cette espace a beaucoup d'autres fonctions, notamment dans certaines étapes de la synthèse de protéine et dans le métabolisme. Cette espace se situe entre la couche de peptidoglycane et la membrane plasmique (Le minor .L, veron .M ,1989). Les bactéries à Gram positif se cultivent, pour la plupart, facilement dans les milieux de base ; on dit que ce sont des germes non exigeants. La plupart des coques, les bactéries de formes rondes, sont des Gram+, et de nombreux bacilles, bactéries de formes allongées en batonnets, sont aussi des Gram positif (Le minor. L, veron .M ,1989).

• **Les bactéries à Gram Négatif :** (*Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli*)

Les bacilles à Gram négatif ont manifesté vis-à-vis des antibiotiques un pouvoir d'adaptation de plus en plus grand qui a abouti à des problèmes thérapeutiques encore aigus. Les bactéries à Gram négatif ont une structure biomembrane qui est organisée en trois grandes parties :

- La membrane externe
 - L'espace périplasmique (comportant notamment la paroi avec le peptidoglycane)
 - La membrane plasmique qui est presque pareil que la membrane externe
- (Prescott.LM *et al.*, 1995).**
- Les bacilles à Gram négatif hôtes naturels de l'intestin et de l'environnement sont responsables d'infections urinaires.