

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} BERRAHOU Hayat et BELMILOU Fatima

Pour l'obtention du diplôme de Master en
Master en Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Thème

**Détermination du pouvoir Antibactérien et Antifongique des Huiles
Essentielles de *Salvia officinalis* L. et d'*Artemisia herba alba* L.**

Soutenu publiquement le .../06/2018

Devant le Jury :

Président M. BOUZNAD AHCENMaitre de conférences (Université de Mostaganem)

Encadreur M. CHADLI Rabah Professeur (Université de Mostaganem)

Examineur M. DJIBAOUI RachidProfesseur (Université de Mostaganem)

Thème réalisé au Laboratoire Protection, Valorisation des
Ressources Marines Littorales et Systématique Moléculaire

2017/2018

REMERCIEMENTS

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

Nous sommes en effet reconnaissantes 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. BOUZNAD Ahcen maitre de conférences qui nous fait l'honneur d'être le président de jury de ce mémoire. Nous sommes également très honorées de la présence, dans ce jury du Pr. DJIBAOUI Rachid en tant qu'examineur. Nous voulons également remercier Mr. ARABI Abed Docteur à l'université de Mostaganem, 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 laborantine au laboratoire de Microbiologie et Biologie Végétale et aussi Mrs BENBOUZIANE Djilali et SOUANE Aek du Laboratoire pédagogique, pour leurs aides dans la réalisation des tests antibactériens.

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 et d'Ain Tedles pour leur soutien et leur sympathie.

HAYET+ FATIMA

DEDICACES

Je dédie ce travail :

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

Ames 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 très bonne condition.

*Ames très chers frères : GHALI, DJILALI,
SIDHMO ET KAMAL.*

A mes très chers sœurs : KAHLA ET FATIHA

Qui m'ont encouragé à finir mes études et aller jusqu'au bout a qui je souhaite tout les bonheurs de monde « Que dieu les protège » Ames amis :

FATIHA, SARA, HAJAR, HANANE

Je le dédie également à A tout la promotion d'ingénieur d'état en Microbiologie appliquée 2018.

HAYET

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à ceux que j'aime du fond de mon cœur, à qui je dois la vie et qui n'ont cessé, à aucun moment, de me soutenir et de m'encourager par leurs prières et leurs sacrifices Mes cher parents:

*Mon père **Mohamad** et ma mère **ZOHRA**,*

Aussi je dédie ce travail à mes frères ; à tous les familles.

A tous mes amis et camarades, a tous les étudiants du Master II biologie Et tous que connue moi.

FATIMA

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 et antifongique 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.* et *Artemisia alba herba L.* par le procédé d'hydrodistillation.

Dans un second temps, notre travail s'est orienté vers la mise en évidence de l'activité antibactérienne et antifongique de ces huiles sur les souches bactériennes et fongiques pathogènes, les plus incriminées dans les infections intestinales et nosocomiales (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans*) en employant la méthode d'antibiogramme et aromatoگرامme.

Les diamètres d'inhibition obtenus pour *Staphylococcus aureus* sont de 9 mm avec une CMI de 0,25 % de concentration en huiles essentielle et pour *Pseudomonas aeruginosa* sont de 8 mm pour une CMI de 0.1.25 %, alors que pour *Candida albicans* le diamètre d'inhibition est de 47 mm pour une CMI de 0.00098 %. dans le cas d'utilisation des huiles essentielles des feuilles sèches d' *Artemisia herba alba L.*

Dans le cas des huiles essentielles des feuilles sèches de la sauge (*Salvia officinalis L.*), les diamètres d'inhibition sont de l'ordre de 9 mm pour *Staphylococcus aureus* pour une CMI de 0.5% et pour *Candida albicans* , ils sont de 10 mm pour une CMI de 0.0156% par contre n'a pas de diamètre d'inhibition pour *Pseudomonas aeruginosa* .

Par contre, l'action de l'huile essentielle de *Salvia officinalis L.* même à une concentration égale ou supérieure à 2% a été insuffisante pour arrêter la croissance des bactéries et des levures testées.

Le Rendement en huiles essentielles de *Salvia officinalis* avoisine les 0.27 % et celui d'*Artemisia herba alba* les 0,39 %.

Mots-clés : huiles essentielles, activité antibactérienne, hydrodistillation, pathogène,

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 and antifungal activity of the essential oils of some aromatic plants.

In a first step, this study focuses on the extraction of these metabolites from autochthonous plants from the Algerian West namely *Salvia officinalis* L. and *Artemisia alba herba* L. by the hydrodistillation process.

In a second step, our work focused on demonstrating the antibacterial and antifungal activity of these oils on pathogenic bacterial and fungal strains, the most incriminated in intestinal and nosocomial infections (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*) using the antibiogram and aromatogram metho

The diameters of inhibition obtained for *Staphylococcus aureus* are 9 mm with a MIC of 0.25% concentration of essential oils and for *Pseudomonas aeruginosa* are 8 mm for a MIC of 0.1.25%, whereas for *Candida albicans* the diameter inhibition is 47 mm for a MIC of 0.00098% .In the case of using the essential oils of dry leaves of *Artemisia herba alba* L.

In the case of essential oils of dry leaves of sage (*Salvia officinalis* L), the diameters of inhibition are of the order of 9 mm for *Staphylococcus aureus* for a MIC of 0.5% and for *Candida albicans*, they are 10 mm for a MIC of 0.0156%.

On the other hand, the action of the essential oil of *Salvia officinalis* L. even at a concentration equal to or greater than 2% was insufficient to stop the growth of bacteria and yeasts tested.

The yield in essential oils of *Salvia officinalis* is around 0.27% and that of *Artemisia herba alba* is 0.39%.

Keywords: essential oils, antibacterial activity, hydrodistillation, pathogen , MIC.

ملخص

إن الزيوت الأساسية ومكوناتها لها تاريخ طويل كعوامل مضادة للميكروبات ، ولكن استخداماتها كمضاد للميكروبات في مجال الأغذية الزراعية نادرا ما يتم الإبلاغ عنها يهدف هذا العمل إلى المساهمة في إظهار النشاط المضاد للميكروبات والفطريات للزيوت الأساسية لبعض النباتات العطرية

أولاً، تركز هذه الدراسة على استخراج هذه المركبات من النباتات المحلية في غرب الجزائر وهي

Salvia officinalis L. و *Artemisia herba alba* L. بواسطة عملية التقطير البخار.

ثانياً، يتم توجيه عملنا نحو اكتشاف النشاط المضاد للبكتيريا ومضاد للفطريات من هذه الزيوت على السلالات البكتيرية

والفطرية المسببة للأمراض، وأكثرها المتورطين في الالتهابات المعوية والمستشفيات (*Staphylococcus aureus*،

Pseudomonas aeruginosa , *Candida albicans*) باستخدام طريقة (Antibiogramme و Aromatogramme)

يبلغ قطر تثبيط للمكورات العنقوديات الذهبية (*Staphylococcus aureus*) 9 ملم مع تركيز MIC بتركيز 0.25%

من الزيوت العطرية وبالنسبة لـ *Pseudomonas aeruginosa* تكون 8 مم لمعدل MIC 0.125 % ، في حين أن القطر

Candida albicans التثبيط هو 47 مم بنسبة 0.00098%. في حالة استخدام الزيوت الأساسية للأوراق الجافة من

Artemisia herba alba L

في حالة الزيوت العطرية للأوراق الجافة من المرمية (*Salvia officinalis* L) ، يبلغ قطر الأقطان 9 مم للمكورات

العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* ل بنسبة 0.5% MIC و *Candida albicans* ، فهي 10 مم) لـ MIC

من 0.0156%

من ناحية أخرى ، كان عمل الزيت العطري . *Salvia officinalis* L حتى عند تركيز يعادل أو أكبر من 2 %

غير كاف لوقف نمو البكتيريا والخميرة المختبرة.

لعائد في العطرية من الزيوت *Salvia officinalis* L من حوالي 0.27 % . و أن *Artemisia herba alba* L

من حوالي 0.27 %

العلامات: الزيوت الأساسية ، والنشاط المضاد للبكتيريا ، التقطير المائي ، الممرض ،

Liste des Abréviations

ANOVA : Association Française de Normalisation

CAZ : Ceftazidim

CCM : Chromatographie sur couche mince

CIP : Ciprofloxacine

CIPC : Ciprofloxacine

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CN : Gentamycine

CPG-SM : Chromatographie en Phase Gazeuse et la Spectrométrie de Masse

DMSO : DiMethyl Sulf Oxide

FF : Fosfomycine

HE ou HEs :Huiles Essentielles

HPLC : Chromatographie liquide à haute performance

IPM : Imipénème

McF : McFarland

MH : Mueller -Hinton

OX : Oxacilline

PLP : Pnicilline

Rf : Référence frontale

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

SDA : Sabouraud Dextrose Agar

TMN : Tobrammycine

TTS : Toxic Shock Syndrome

U.V : Ultra-Violet

VIH : Virus de la Immunodeficiencia Humana

VA : Vancomycine

YPA : Yeast Peptone de Dextrose

Liste des figures

Figure 1 : Schéma du principe de technique d'hydrodistillation

Figure 2 : Schéma du principe de la technique de l'entraînement à vapeur

Figure 3 : Schéma du système d'extraction des HEs par un fluide supercritique

Figure 4a: Structure chimique de quelques composés des huiles essentielles

Figure 4b: Structure chimique de quelques composés des huiles essentielles

Figure 5 : Chambre de développement à cuve verticale et plaque de CCM

Figure 6: Photographies de *Salvia officinalis L.*

Figure 7: *Artemisia herba alba L.*: la plante au début de la saison de floraison, (B) la plante à la fin de la saison de floraison

Figure:8 : Structures chimiques de quelques composés rencontrés dans l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba*

Figure 9 : Les flavonoïdes de l'*Artemisia herba alba*

Figure 10 : Schéma présente les étapes de l'antibiogramme et aromatoigramme

Figure 11: Schéma présente la méthode de la détermination de la CMI

Figure 12 : Représentation graphique des diamètres d'inhibitions de *Staphylococcus aureus* vis -à-vis des différents antibiotiques (**Gentamycine (CN)**, **Fospomycine (FF)**, **Ciprofloxacine (CIP)**, **Tobrammycine (TMN)**, **Vancomycine (VA)**)

Figure 13: Représentation graphique des diamètres d'inhibitions de *Pseudomonas aeruginosa* vis -à-vis des différents antibiotiques (**Fospomycine (FF)**, **Tobrammycine(TMN)**, **Gentamycine(CN)**, **Ciprofloxacine(CIP)**,**Imipénème (IPM)** ,**Ceftazidim ,(CAZ)** **Oxacilline(OX)**)

Figure 14 : Représentation graphique des diamètres d'inhibitions de *Candida albicans* vis-a-vis de deux antifongiques différents (Econazole, Clotrinazole)

Figure 15: Histogramme de comparaison des zones d'inhibition

Liste des Photos

Photo 1 : *Salvia officinalis L.* Poussant dans le campus (ITA)

Photo 2 : *Artemisia herba alba* dans son état naturel

Photo 3 : Appareil d'hydrodistillation (Clevenger)

Photo 4 : Quantité d'Huile essentielle recueillie dans des flacons

Photo 5 : Les huiles essentielles obtenues par l'hydrodistillation

Photo 6 : Aspect macroscopique de *Pseudomonas aeruginosa* ensemencé 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 : Aspect macroscopique de *Candida albicans* ensemencée sur milieu de Sabouraud Chloramphénicol.

Photo 11 : Aspect macroscopique de *Candida albicans* ensemencée sur milieu de Gélose Nutritive

Photo 12 : Observation microscopique de *Pseudomonas aeruginosa* après coloration par un grossissement X(100) (Gram négatif).

Photo 13 : Observation microscopique de *Staphylococcus aureus* après coloration par un grossissement X(100). (Gram positif)

Photo 14 : Observation microscopique de *Candida albicans* après coloration par un grossissement X(100). (Gram négatif).

Photo 15 : Observation microscopique de *Candida albicans* (test de bourgeonnement des cellules) au grossissement X100.

Photo16 : Observation microscopique de Test de *Chlamydosporulation* de *candida albicans* sur milieu minéral

Photo 17 : Résultat du test catalase positif de *Pseudomonas aeruginosa*

Photo 18 : Résultat du test catalase positif de *Staphylococcus aureus*

Photo19 : Résultat du test oxydase positif de *Pseudomonas aeruginosa*

Photo 20 : Résultat du test oxydase négatif de *Staphylococcus aureus*.

Photo 21 : Effet des antibiotiques sur la croissance de trois souches de *Staphylococcus aureus* sur milieu Mueller Hinton.

Photo 22 : Effet des antibiotiques sur la croissance de trois souches de *Pseudomonas aeruginosa* sur milieu Mueller Hinton

Photo 23 : Effet des antifongiques sur la croissance de deux souches de *Candida albicans* sur milieu Mueller Hinton.

Photo 24 : Effet de l'huile essentielle des feuilles sèches de *la sauge* (*Salvia officinalis* L.) sur la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* [1] et *Staphylococcus aureus* [2] et *Candida albicans* [3] sur milieux Mueller Hinton

Photo 25 : Effet de l'huile essentielle des feuilles sèches de *Artemisia herba alba* L. sur la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* [1] et *Staphylococcus aureus* [2] et *Candida albicans* [3] sur milieu Mueller Hinton.

Photo 26: 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 boite 2.

Photo 27: Concentration minimale inhibitrice d'huile essentielle des feuilles sèches de *la sauge* (*Salvia officinalis* L.) sur la croissance de *Candida albicans* sur milieu Mueller Exacte boite 7.

Photo 28 : Concentration minimale inhibitrice d'huile essentielle des feuilles sèches *Artemisia herba alba* sur la croissance *Staphylococcus aureus* sur milieu Mueller Hinton. Exacte boite 3.

Photo 29 : Concentration minimales inhibitrice d'huile essentielle des feuilles sèches *Artemisia herba alba* sur la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* sur milieu Mueller Hinton, Exacte boite 4.

Photo 30 : Concentration minimales inhibitrice d'huile essentielle des feuilles sèches *Artemisia herba alba* sur la croissance de *Candida albicans* sur milieu Mueller Hinton .Exacte boite 11.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Salvia officinalis* L.

Tableau 2 : Principales classes de composés phénoliques identifiées dans les feuilles de *Salvia officinalis* L.

Tableau 3 : Quelques membres représentatifs de la flore normale dans diverses parties du corps humain

Tableau 4 : La source de souches pathogènes testées

Tableau 5 : Le matériel réservé à l'hydro-distillation

Tableau 6 : Détermination des rendements des huiles essentielles M_{HE} en fonction de la matière végétale utilisée de (*Salvia officinalis* L.) et les volumes de l'eau distillées.

Tableau 7 : Détermination des rendements des huiles essentielles M_{HE} et de la quantité matière végétale utilisée d'*Artemisia herba alba* L. et les volumes de l'eau distillée utilisée

Tableau 8 : Résultats de l'antibiogramme de *Staphylococcus aureus*

Tableau 9 : Résultats de l'antibiogramme de *Pseudomonas aeruginosa*.

Tableau 10 : Résultats de l'antifongique de *Candida albicans*

Tableau 11 : L'effet antimicrobien des huiles essentielles d'*Artemisia herba alba* L. et *Salvia officinalis* L. sur *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* et sans utilisation des substances émulsifiantes.

Tableau 12 : Concentration de CMI des huiles essentielles des plantes aromatiques sur les souches testées.

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

Sommaire :

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

Chapitre II : Les plantes aromatiques et médicinales (PAM)	22
II.1. Etude de la Sauge (<i>Salvia officinalis</i> L.	22
II.1.1 La famille des Lamiaceae.....	22
II.1.2. Le genre <i>Salvia officinalis</i> L.	22
II.1.3.. Description morphologique	22
II.1.4. Classification taxonomie	24
II.1.5. Répartition géographique	24
II.1.6. Propriétés des sauges et usages traductionnel.....	24
II.1.7. Composition chimique.....	25
II.1.7.1 Huiles essentielle.....	25
II.1.7.2 Les composés phénoliques :	26
II.2. Etude d'Armoise blanche <i>Artemisia herba alba</i> L.	27
II.2.1.La Famille des Asteraceae martinov.....	27
II.2.2. Le genred' <i>Artemisia herba alba</i> L.....	28
II.2.3 .Description morphologique	28
II.2.4. Classification taxonomie	29
II.2.5. Répartition géographique	30
II.2.6. Propriétés d' <i>Artemisia herba alba</i> L.et usages traductionnel.....	30
II.2.7. Composition chimique.....	30
II.2.7.1 Huiles essentielle.....	30
II.2.7.2. Les composés phénoliques :	31
Chapitre III : Généralités sur les maladies infectieuses	33
III.1. Les maladies infectieuses :.....	33
III.1.1. La flore microbienne normale de l'homme	33
III.1.2. Les infections nosocomiales	34
III.2. Généralités sur les microorganismes pathogènes	34
III.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	34
III.2.1.1.Généralité:.....	34
III.2.1.2.Classification :.....	35
III.2.1.3. Habitat	35
III .2.1.4 .Caractères morphologiques:.....	35
III .2.1.5. Caractéristiques biochimiques:.....	36
III.2.1.6. Pouvoir pathogène	36
III.2.1.7. Résistance aux antibiotiques	37
III.2.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37
III.2.2.1. Généralités.....	37
III.2.2.2 .Classification.....	38
III.2.2.3. .Habitat	38
III .2.2.4. Caractères morphologiques :.....	39
III.2.2.5. Caractéristiques biochimiques.....	39
III.2.2.6. Pouvoir pathogènes	40
III.2.2.7. Résistance aux antibiotiques.....	40
III.2.3. <i>Candida albicans</i> :.....	40
III.2.3.1 .Généralité	40
III.2.3.2. Classification.....	41
III.2.3.3. Habitat	41
III.2.3.4. Caractéristiques morphologiques.....	42
III.2.3.4. Critère d'identification	42
III.2.3.5. Pouvoir pathogènes	42

Partie II : Partie expérimentale

Partie II : Matériel et méthodes	44
II.1 Matériel biologique	44
II.1.1 Matériel végétal	44
II.2. Méthodes	45
II.2.1. Extraction des HEs de <i>Salvia officinalis L.</i> et <i>Artimisia herba alba L.</i>	45
II.2.2. Dispositif d'extraction des HEs.....	45
II.2.3. Procédé d'extraction des HEs.....	46
II.2.4. Conservation de l'huile essentielle obtenue	46
II.2.5. Détermination de rendement d'extraction	47
II.3. Matériel microbiologique	47
II.3.1. Origine des souches pathogènes testées	47
II.3.2. Matériel utilisé	48
II.4. Confirmation de l'identification des souches	49
II.4.1. Etude macroscopique.....	49
II.4.2. Etude microscopique.....	49
II.4.2.1 Coloration de Gram.....	49
II.4.2.2. Test de catalase	49
II.4.2.3. Test d'oxydase.....	49
II.4.3. Test spécifiques à <i>Candida albicans</i>	50
II.4.3.1. Test de blastes (Tube germinatif)	50
II.4.3.2. Test de Chlamydosporulation	50
II.4.3.3. Croissance à 45°C.....	50
II.5. Test d'Antibiogramme	51
II.6. Test du pouvoir antibactérien et antifongique des H Es	53
II.6.1. Préparation des disques.....	53
II.6.2. Préparation de l'inoculum microbien	53
II.6.3 Les huiles essentielles utilisées.....	53
II.6.4. Dépôt des disques	54
II.7. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) sur milieu solide	54
II.7.1. Principe de la concentration minimale inhibitrice CMI	54
II.7.2. Préparation inoculum microbien	55
II.7.3. Préparation des dilutions des huiles essentielles	57
Partie III : Résultats et discussion	57
III.1. Résultat d'extraction et rendement en huile essentielle	57
III.2. Testes microbiologique	59
III.2.1. Etude macroscopique.....	59
III.2.2. Etude microscopique.....	61
III.2.2.1. Coloration de Gram.....	61
III.2.2.2. Test de Chlamydosporulation	63
III.2.2.3. Test de catalase.....	64
III.2.2.4. Test d'oxydase.....	64
III.3. Test d'antibiogramme	65
III.3.1. L'effet des antibiotiques sur la croissance de <i>Staphylococcus aureus</i>	67
III.3.2. L'effet des antibiotiques sur la croissance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	68
III.3.3. L'effet des antibiotiques sur la croissance de <i>Candida albicans</i>	69
III.4. Résultat du test du pouvoir antibactérien et antifongique des HEs	70
III.6. Détermination de concentrations minimales inhibitrices (CMI)	72
III.7. Discussion	75
III.7.1. Rendement en huile essentielle.....	75
III.7.2. Pouvoir d'activité antimicrobienne (antibactérienne et antifongique).....	75
III.7.3. Détermination de concentrations minimales inhibitrices (CMI).....	76
Conclusion	78
Références bibliographiques	80
Annexes	



Introduction

Introduction

Introduction

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 (**MESSAIL,2011**)

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 antibiotiques nous a conduit à nous intéresser à l'inépuisable source de produits naturels à vertu antimicrobien: les plantes médicinales (**BOUZIDI, 2016**).

Les huiles essentielles (H.E.) sont des substances qui occupent une place particulière dans leur utilisation en médecine, en aromathérapie et en agroalimentaire (**RADULESCU *et al.* ; 2004**). Nos ancêtres utilisaient des huiles essentielles de certaines plantes comme le lentisque pistachier (*Pistacia lentiscus L.*), 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 (**ZERROUKI, 2017**).

L'objectif de notre travail est basé sur l'évaluation de l'activité antimicrobienne et antifongique des huiles essentielles extraites par hydrodistillation à partir des espèces végétales de l'Ouest Algérien à savoir la Sauge (*Salvia officinalis L.*) et l'Armoise (*Artemisia herba alba L.*). La concentration minimale inhibitrice (CMI) a été déterminée pour chaque huile essentielle vis-à-vis de certaines bactéries pathogènes entre autres: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans* (levure).



Partie

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'année 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 modifié au cours de la préparation (BRUNETON, 1999).

Plus récemment, la norme (AFNOR NF T 75-006 5 février1998) 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 HEs 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)(**BOGCHI et 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 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 normal. 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, 2005).

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. Entraînement 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**).

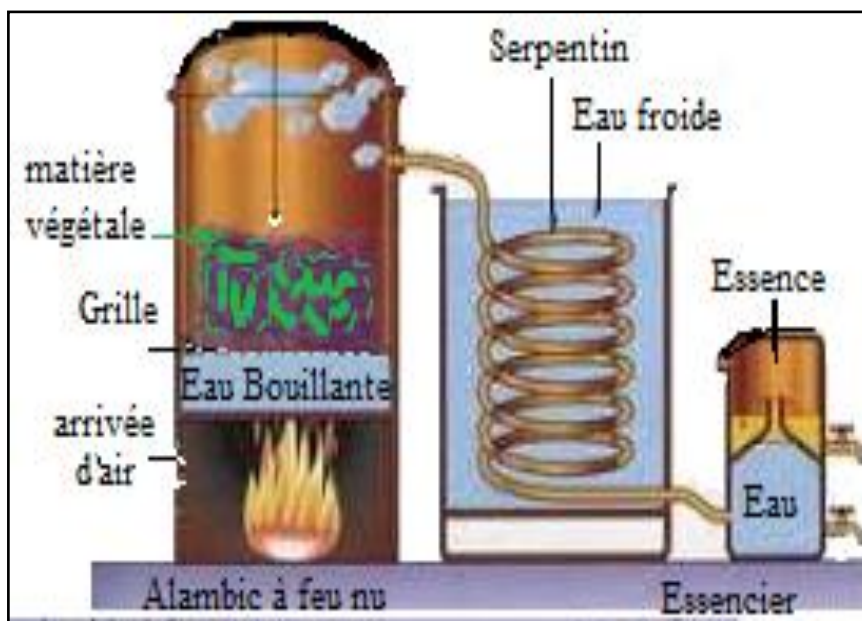


Figure 2 : Schéma du principe de la technique de l'entraînement à vapeur (LUCCHESI, 2005)

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 , Indore, 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).**

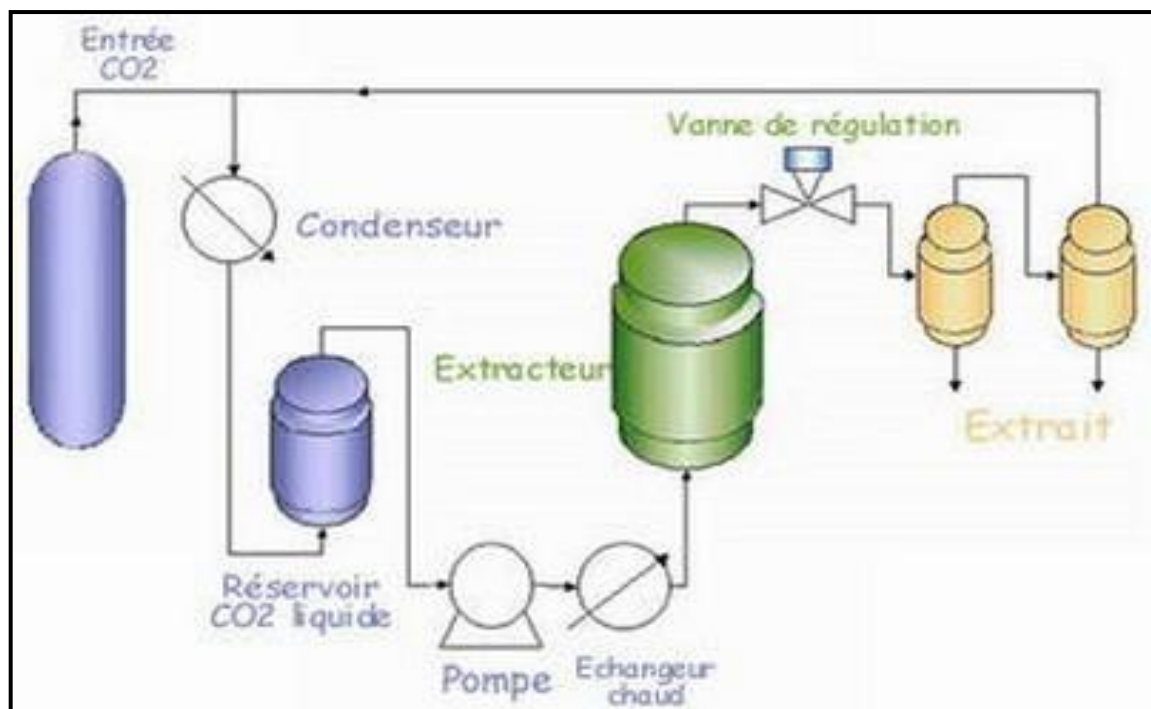


Figure 3 : Schéma du système d'extraction des HEs par un fluide supercritique (BEN AMOR, 2008)

I.6.8. Extraction par micro- onde

L'origine ancestrale de cette technique est la distillation qui 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).

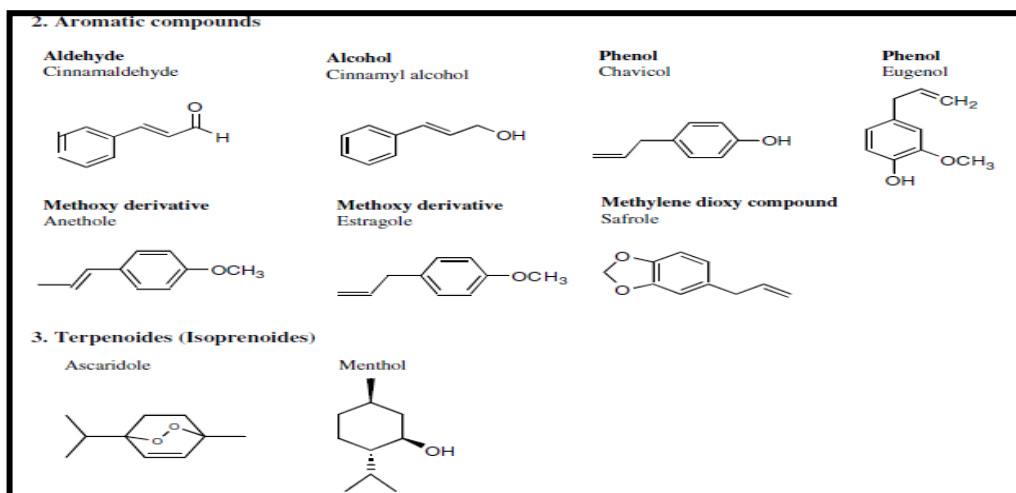


Figure 4a: Structure chimique de quelques composés des huiles essentielles (BAKKALI *et al.*; 2008)

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 cœlentérés (**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 phenylpropane

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 biogénèse 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, méthyl-chavicol=estragole. Persil : apiole) 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 C_6-C_1 comme la vanilline (assez fréquente) ou comme l'anthranilate 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.

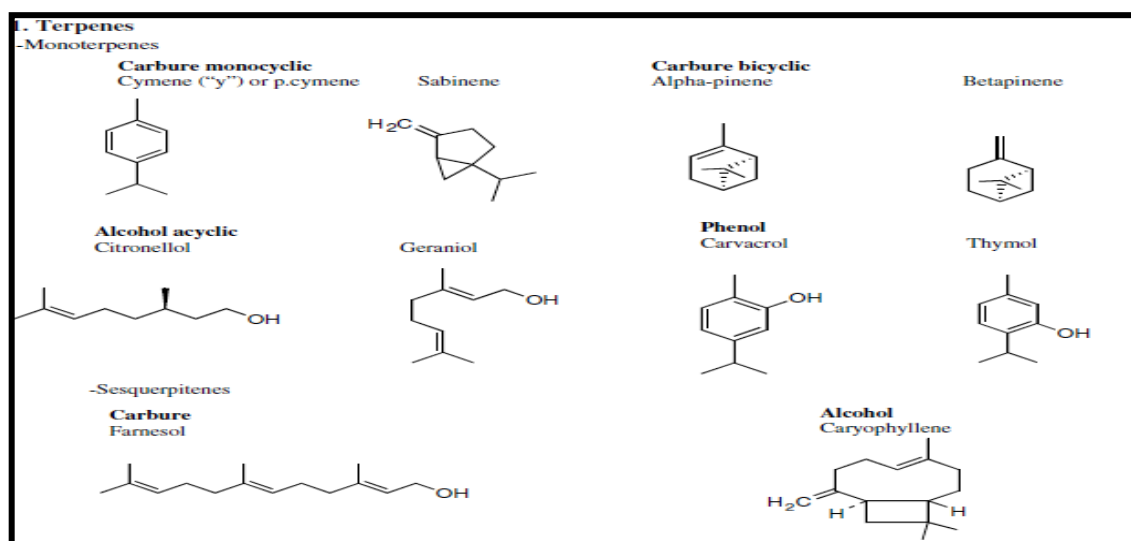


Figure 4b: Structure chimique de quelques composés des huiles essentielles (BAKKALI *et al* ; 2008)

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 progressent 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..

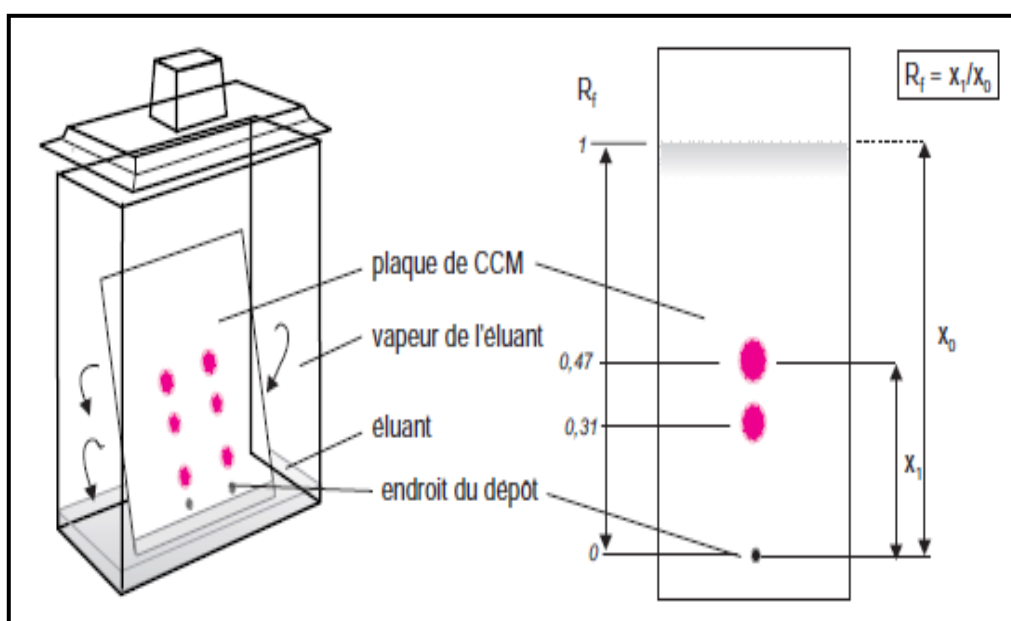


Figure. 5 : Chambre de développement à cuve verticale et plaque de CCM (ROUESSAC, 2004)

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 in BENCHEIKH, 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, géranial, 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 (**SCHNITZLER *et al.* ; 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 *et al.*, 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- REDDY *et 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 (**BOUZOUTA *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 et sont par 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 du caracole sur la fécondité et le nombre d'œufs pondus du haricot (REGNAULT –ROGER et HAMRAOUI, 1995).



Chapitre III

Chapitre II : Les plantes aromatiques (PAM)

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

II.1. Famille des Lamiacées

La famille des Lamiacées (labiales) 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 iridoïdes 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 1ère histoire, une variété de sauge appelée « 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 à 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 bilabiée comprend 5 pétales soudés, 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 :

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

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 a l. ; 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 (%)
-thuyéne	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-terpeniole	0,81
α -terpinène	0,89	Acetate	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 commendes constituantes principales), des tanins catéchiques, des acides polyphénols carboxyliques (rosmarinique, caféique, chlorogénique, p -coumarique et férulique), des principes amers diterpéniques, des triterpénepentacycliques (acides ursolique, crategolique, 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 3-0-caffeoylquinique, Acide 5-0-caffeoylquinique, Acide caféique, Acide rosmarinique, Acide salvianolique et dérivée, Melitrane A méthyl saugecoumarine, Acide saugerinique, Tanshinone II A, Acide lithospermique, Acide yunnanéiques, 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, Apigenine, Hispiduline, Cirsimaritine, Genkwanine, Lutéoline et Luteoline 7-glucoside.
Tannins	Catéchine et Salvia tannins.

II. Etude d'Armoise blanche « *Artemisia herba alba L.* » in BOUZIDI, 2016

II.1. Famille des Asteraceae martinov (1820)

Il s'agit de la plus vaste famille des phanérogames, avec 1530 genres et plus de 23000 espèces. Les *Asteraceae* peuvent se recoder sur toute la surface du globe. Néanmoins, elles sont particulièrement diversifiées dans les régions sèches, comme le Bassin Méditerranéen, l'Afrique australe, le Mexique et le Sud-Ouest des Etats-Unis, les régions arides d'Amérique du sud. Cette famille est définie par deux caractères suivants: groupement des fleurs en capitules et soudure des étamines par leurs anthères [OZENDA, 1983].

Elles sont des plantes angiospermes dicotylédones appartenant aux sous classes des gamopétales ou astérides (*Asteridae*) et à l'ordre des Astéras. Les astéracées peuvent être annuelles, bisannuelles ou vivaces. On y trouve surtout des plantes vivaces et à feuilles alternes.

Dans la grande majorité des cas, les astéracées sont des plantes herbacées mais elles sont également représentées par des arbres, des arbustes ou des lianes, certaines sont également succulentes (**BARKEY *et al.* ; 2006**).

II.2. Le genre *Artemisia*

Les plantes du genre *Artemisia* (*Asteraceae*) sont une riche source de sesquiterpène bioactif lactones et ont une longue histoire de lutte contre plusieurs pathologies chez les humains et, plus récemment, chez les animaux (**JORGE *et al.* ; 2011**). Le nom "*Artemisia*" est dérivé de la déesse Artémis qui avait découvert les effets de la plante, alors que le mot "absinthe" signifie imbuvable à cause du goût très amer de la centrale (**YILDIZ *et al.* ; 2011**).

Cette plante connue aussi sous le nom l'Absinthe du désert (connu en arabe comme Chih, Armoise blanche (Français.) (**SEGGAL *et al.* ; 1987**). Elle a été utilisée dans la médecine traditionnelle par de nombreuses cultures depuis les temps anciens.

II.3. Description morphologique

L'Armoise herbe blanche est une plante herbacée à tiges ligneuses (**POTTIER, 1981**), ces tiges sont rigides et droites (**COLINE, 2002**) et ramifiées, de 30 à 50cm, très feuillées avec une couche épaisse (Fig7). Les feuilles sont petites, sessiles, pubescentes et aspect argenté. Les fleurs sont groupées en grappes, à capitules très petites (3/1,5mm) et ovoïdes. L'involucre est à bractées imbriquées, les externes orbiculaires et pubescentes. Le réceptacle floral tenu avec 2 à 5 fleurs jaunâtres par capitule. Elles sont tous hermaphrodites (**POTTIER, 1981**).

La floraison de cette espèce débute le plus souvent en juin mais les fleurs se développent essentiellement à la fin de l'été. Lors des années pluvieuses et dans les sols qui lui conviennent, l'*Artemisia herba-alba* présente une forte production de graines et un pouvoir de régénération élevé (**MATTEUCCI, 2008**).



Figure 7 : *Artemisia herba alba* :L. : la plante au début de la saison de floraison, (B) la plante à la fin de la saison de floraison (MESSAI, 2011)

II.4. Classification taxonomie

Le genre *Artémisia* appartient à la famille des composés, il comprend environ 400 espèces regroupées en quatre sections : *Abrotanum*, *Absinthium*, *Seriphidium* et *dracunculus*. La classification d '*Artemisia herba alba* la plus utilisée dans la systématique du genre *Artémisia* est celle donnée par **Quenzel et Santa 1963** et que nous pouvons résumer comme suit:

Embranchement : Spermaphytes
Sous-embranchement : Angiospermes
Classe: Dicotylédones : gamopétales
Sous-classe : Gamopétale Epigynes Isotémons
Ordre : Astérales
Famille : Astéracées
Sous-famille : Tubiliflores
Tribu : Anthémidées
Genre : *Artemisia*
Espèce : *herba alba L.*

II.5. Répartition géographique

L'armoise blanche présente une vaste répartition géographique couvrant, en Algérie, environ 4 millions d'hectares et se développe dans les steppes argileuses et les sols tassés relativement peu perméables. Elle se trouve sur les dayas, les dépressions et les secteurs plus ou moins humide. Elle constitue un moyen de lutte contre l'érosion et la désertification (AYAD *et al.* ; 2013).

Ce genre se trouvent principalement dans les zones arides et semi arides d'Europe, d'Amérique, l'Afrique du nord ainsi qu'en Asie (PROKSCH *et al.* ; 1992). Qui abonde au moyen-orient, dans le sud Algérien et au Maroc, sur sable profonds (BOULLARD, 2001).

I.6.7. Propriétés d'*Artemisia herba alba* et usages traductionnel

L'*Artemisia herba alba* est très utilisé en médecine traditionnelle lors d'un désordre gastrique tel que la diarrhée et les douleurs abdominales. Elle est aussi utilisée en tant que remède de l'inflammation du tractus gastro-intestinal (GHARABI, 2008). De loin le plus fréquemment cité est l'utilisation de *l'Artemisia herba alba L.* dans le traitement du diabète sucré (TWAJHA et Al-BADRE, 1988).

Plusieurs études scientifiques ont également prouvées l'efficacité de l'armoise blanche en tant qu'agent antidiabétique, les hmanicide ,antiparasitaire, antibactérien, antiviral, antioxydant, antimalarien, antipyrétique, antispasmodique et antihémorragique (BOUDJELAL, 2013).

II.7. Composition chimique du genre *Artemisia*

II.7. Huile essentielle

Au cours des dernières décennies, l'huile essentielle de l'armoise blanche a été soigneusement étudiée et la diversité dans la composition de cette huile recueillie dans différents pays a conduit à de nombreux chemotypes. Généralement, l'huile a été en grande

partie rapporté être composée de monoterpénoïdes, principalement oxygénés tels que le **1-8 cinéole**, chrysanthène, α et β **thujones** et le **camphre** comme composants majeurs [MOHAMED *et al.* ; 2010] (Fig 8).

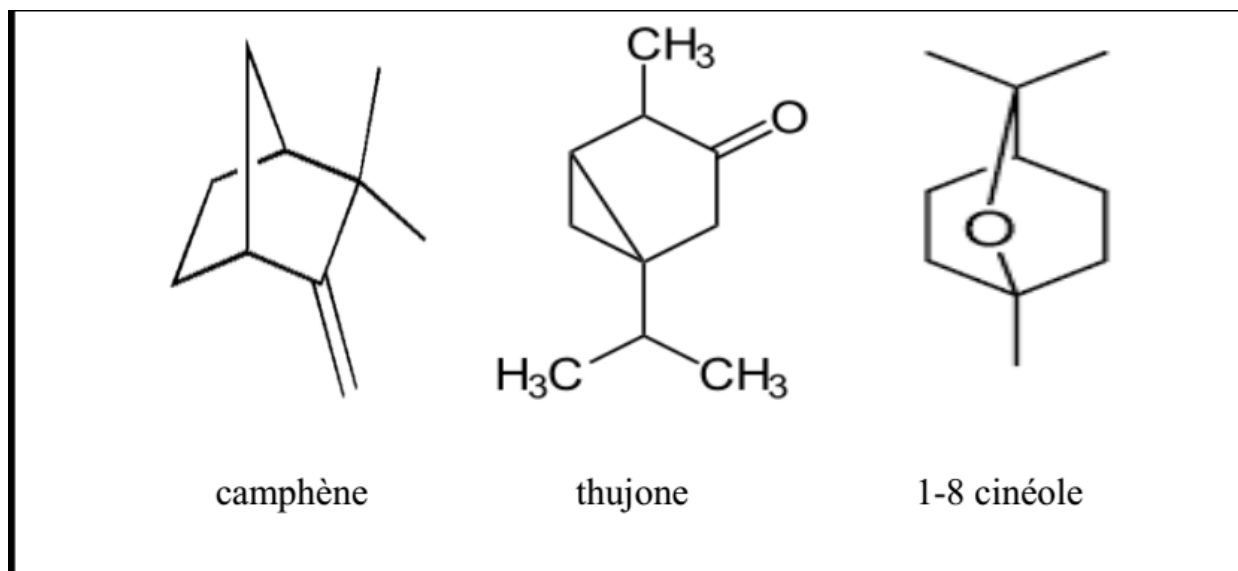


Figure:8 : Structures chimiques de quelques composés rencontrés dans l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* (MOHAMED *et al.*, 2010).

II.7.2.Composés phénoliques

D'autres études ont été portées sur les flavonoïdes et l'huile essentielle, parmi les composants les plus importants des huiles essentielle de l'*Artemisia herba alba L.* on trouve les monoterpènes tels que le 1,8-cineole et le terpène 4 ol, des santonines, des coumarines, des triterpènes pentacycliques et les tanins (GHARABI *et al.*, 2008).

Les flavonoïdes détectés dans *A. herba-alba* montrent une grande variation structurelle, allant de la plus commune des glycosides de flavones et de flavonols aux plus insolites flavonoïdes hautement méthylés. Dans les études sur la vapeur les feuilles d'*A. herba-alba* recueillies du Sinaï, un total de huit flavonoïdes O- et C-glycosides ont été isolés et identifié (SALEH *et al.*, 1985, 1987). L'examen des parties aériennes d'*A. herba-alba* recueillies auprès des magasins de fines herbes du Liban, ont conduit à l'isolement des deux flavonoïdes; hispiduline et cirsilineol (MOHAMED *et al.*, 2010) (Fig 9).

Une nouvelle flavone, 5,4'- dihydroxy-6,7,3''-triméthoxyflavone, a été isolé à partir de l'extrait non glycosidique des parties aériennes d'*Artemisia herba alba* (MOHAMED *et al.*, 2010).

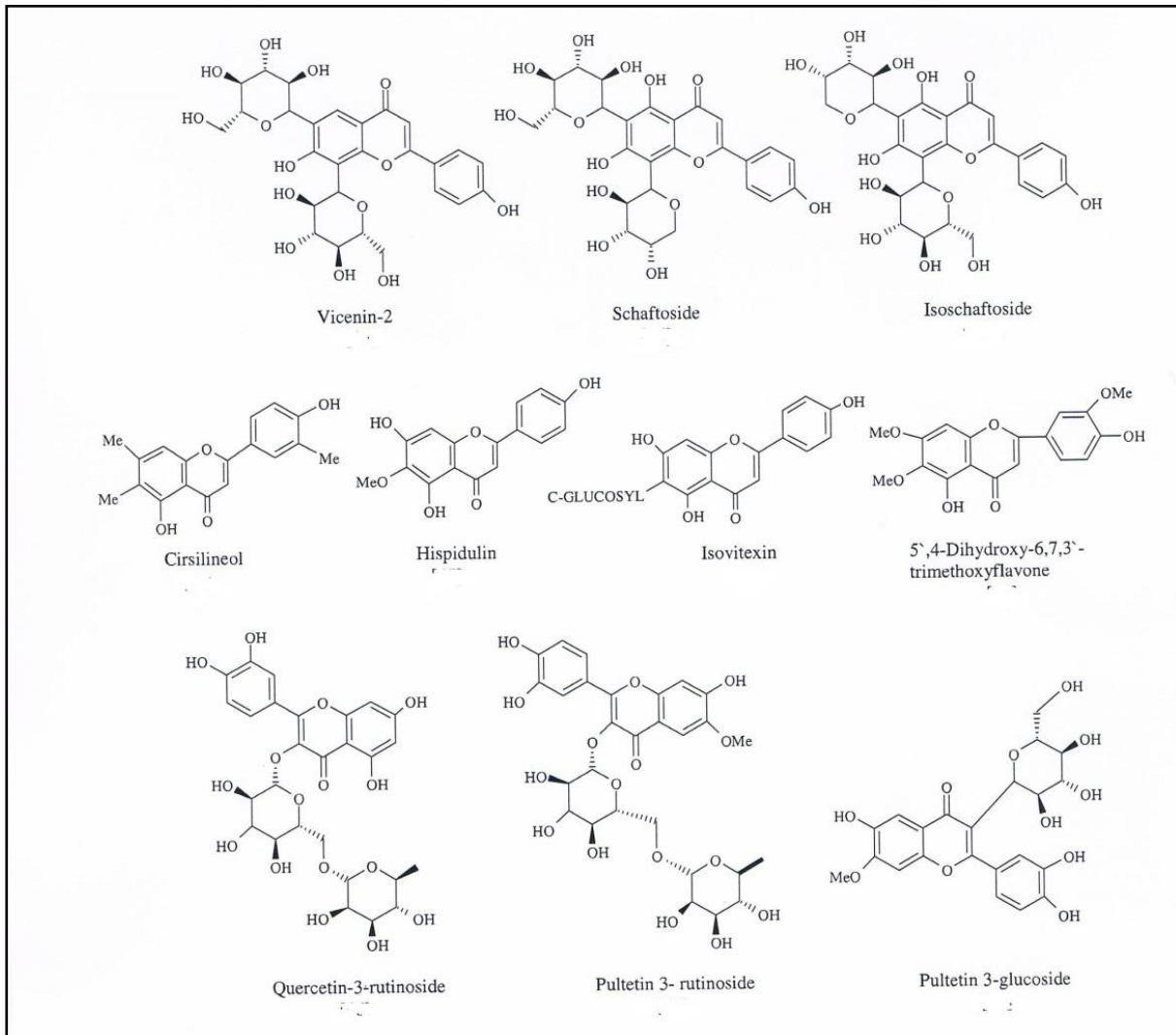


Figure 9 : Les flavonoïdes de l'*Artemisia herba alba* (MOHAMED *et al.*, 2010)



Chapitre III

Chapitre III : Généralités sur les maladies infectieuses

III.1. Les maladies infectieuses

III.1.1. 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).

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> , <i>Corynebacterium diphtheriae</i>
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> , <i>Corynebacterium diphtheriae</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. 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 des 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 situé entre 4, 5 et 7, 6 (**LOUP,1991**). Un espèce *Staphylococcus aureus* (*Staphylocoque doré*) tient une place très importante dans les infection 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 fosse 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 raison). Ils sont immobiles, sporules, habituellement sans capsule.

Ces bactéries sont aéro-anaérobies, à métabolisme respiratoire et fermentaire, se 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 à 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, panaris, 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 aux 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. Commensales 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 (**FAUCHÉRE 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 large gamme de températures (de 4°C à 43°C), avec de nombreuses souches psychrophiles (**BERCHE *et al.* ; 1989**).

Pseudomonas aeruginosa est une bactérien aérobie stricte .Elle croit 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 phototrophe vis avis de nombreuses sources de carbone ; elles 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 gélatinasse et désoxyribonucléase.

Elle est capable de produire la pyocyanine et la pyoverdine , et elle est sensible à la polymixine (**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 sujet dont les défenses sont amoindries . Elle peut provoquer des infections urinaires , bronchiques (en particulier chez les sujet atteints de mucoviscidose), pulmonaires , oculaires (kératite ou enophthalmie), ostéo – articulaires . Elle peut aussi infecter des lésions cutanées (brulures) , des plaies traumatiques ou postopératoires , provoquer des otites externes (pouvant évoluer d'une manière invasive chez les sujet 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 certains nombre sont sensibles à la pipéracilline , imipenème , à la ticarcilline , 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**) .

III.2.3. *Candida albicans*

III.2.3.1. Généralités

Candida albicans est une levure de forme variable ronde à allongée. Commensale dans le tube digestif de l'homme, des mammifères et des oiseaux.

Cette levure est un « opportuniste » qui devient pathogène sous l'effet de facteurs favorisants généraux ou locaux. (**ERNEST ; 1993**). Cette levure vit à l'état saprophyte dans le tube digestif humain où elle est présente dès les premiers mois de la vie, transmise par contact maternel (**AGBO-GODEAU et GUEDJ, 2005**).

Elle existe sous la forme d'éléments unicellulaires bourgeonnants ou d'un pseudomycelium (FEIGIN et CHERRY, 2004). Certaines conditions favorisent son passage à un stade pathogène (BONN ET BLANC, 2008 ; HOPP et BLATENSWEILER, 2009).

L'infection découle habituellement de la prolifération opportuniste du microorganisme, lorsque la flore normale est détruite par des antibiotiques à large spectre ou par d'autres facteurs (humidité, pH acide, personnes immunodéprimées) (REGNAULT, 2002).

Cette levure est responsable de candidoses humaines touchant principalement les muqueuses, les phanères et peuvent même atteindre les organes internes (BOIRON, 1999 ; PFALLER, 2002).

III.2.3.2. Classification (ERNEST , 1993)

<p>Régne : Fungi</p> <p>Division : <i>Ascomycota</i></p> <p>Classe : Saccharomycetes</p> <p>Ordre : Saccharomycetales</p> <p>Famille : Saccaromycetaceae .</p> <p>Genre : <i>Candida</i></p> <p>Espèce : <i>.albicans</i>.</p>

III.2.3.3. Habitat

Candida albicans est une flore microbienne normale de l'homme , peau Muqueuse gastro- intestinales ; Muqueuse gastro-urinaires et Muqueuse respiratoires environnement .C'est un champignon levuriforme présent à l'état saprophyte , commensale des muqueuse oro-pharyngées , gastro-intestinales et génito –urinaire et peut occasionnellement coloniser la peau (RÉNIC ,2007)

III.2.3.4. Caractéristique morphologiques

Candida apparait comme une levure ovale et bourgeonnante qui mesure 2-3 X 4-6µm..Sur gélose au glucose de saboraud , incubée a une température de 38°C, elle développe des colonies lisse , crèmes et qui possèdent une odeur de levure . La croissance de surface consiste en cellules ovale bourgeonnantes. la croissance submergée consiste un pseudomycélium (**ERNEST ,1973**).

III.2.3.5. Critère d'identification

Il existe plusieurs techniques qui permettent d'identifier *C. albicans* en laboratoire comme par exemple :, le teste de germination positif, en effet *Candida albicans* formera un hyphe sans constriction lorsqu'elle est place dans du plasma de lapin à 37 °C.

Le test de chlamydospore sera positif sur milieu RAT dû a la présence de tween 80 ; test de l'uréase négatif sur milieu Christensen et colonie blanche crème, luisante et crémeuse sur gélose au sang ou Saboraud (**BENNETT et al., 2003**).

III.2.3.6. Pouvoir pathogène

La pathogénicité de *Candida albicans* est liée à la phase filamenteuse (**PERRY et al. ;2004**). Elle se fixe aux cellules épithéliales humaines sous forme de levure mais doit généralement produire un pseudomycélium pour envahir les tissus sous jacents (**WHITENAY et BACHEWICH, 2007**).

Elle provoque des infections cutanées et secrètent des protéases qui modifient la membrane des cellules hôtes de façon à permettre l'adhérence du microorganisme puis sa croissance entraîne le plus souvent ,le muguet ou candidose cutané-muqueuse de la bouche

qui atteint souvent les nouveau-nés, dont la flore normale n'est pas encore développée. Elle peut prendre aussi la forme d'une infection vaginale et plus fréquemment, des infections nosocomiales du sang (**DEVELOUX et BRETAGNE, 2005**).

Candida albicans occupe une place prédominante parmi les candidoses (**FIGARELLA et LEYRAL., 1998**). Cependant, dans certaines conditions, en particulier chez les personnes immunodéprimées, les candidoses sont très graves voir mortelles si elles deviennent systématiques et s'attaquent aux systèmes respiratoire, circulaire et nerveux (**RE-GNAULT, 2002 ; CARLE et PHARM, 2003**).

Le taux de mortalité des candidémies s'est élevé de 57% à 72% chez l'adulte et de 20% Chez l'enfant (**STAMOS et ROWLEY, 1995**). Ces microorganismes, sous la pression de la sélection thérapeutique, sont de plus en plus résistants aux antifongiques. En milieu hospitalier, 99% des souches isolées présentent des résistances et rendent ainsi problématique la mise en œuvre contre les infections (**MEYER et al. ;2004**).



Partie

Expérimentale

Partie II : Matériel et méthodes

II.1. Matériel biologique

II.1.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans notre expérimentation repose sur deux plantes aromatiques à savoir *Salvia officinalis* L .récoltée du campus de l'université de Mostaganem ex : ITA (Photo1), et *Artemisia herba alba* L .originaire de la wilaya de Tiaret (Photo2).



Photo 1 : *Salvia officinalis* L. poussant dans le campus (ITA)



Photo 2 : *Artemisia herba alba* dans son état naturel

II.2. Méthodes

II.2. Extraction des huiles essentielles de *Salvia officinalis* L. et *Artemisia herba alba* L.

L'extraction et l'étude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle des feuilles de deux plantes : la sauge (*Salvia officinalis* L.) et Chih (*Artemisia herba alba* L.) qui réalisées au laboratoire pédagogique de la faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'université *Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem* dans la laboratoire de gestion et valorisation des ressources littorales et systématique moléculaire .

II.2.2. Dispositif d'extraction des HEs

L'extraction de l'huile essentielle (HE) des feuilles *Artemisia herba alba* L. et *Salvia officinalis* L. été utilisée sur un appareil d'hydrodistillation de type Clevenger.

Il est constitué d'une chauffe ballon, un ballon en verre pyrex, 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.

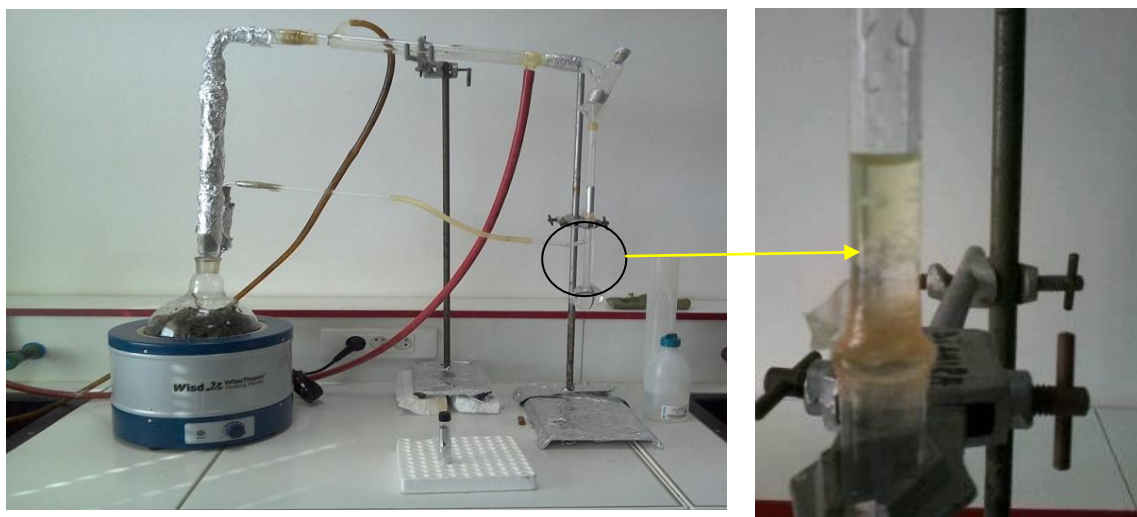


Photo 3 : Appareil d'hydrodistillation (Clevenger)

II.2.3. Procédé d'extraction des HEs

Une quantité de 200g des feuilles sèches *Salvia officinalis* L. est mise dans un ballon en verre pyrex, additionnée de 1500 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 de l'huile essentielle de feuilles sèches de la sauge et sera par la suite récupérée dans un flacon approprié. La même procédure a été adopté pour les feuilles d'*Artimisia herbe alba* L.

IV.2.4. Conservation de l'huile essentielle

La conservation de l'huile essentielle exige certaines précautions indispensables (BURT,2004).

C'est pour cela nous avons conservé de l'huile essentielle et des feuilles sèches à une température voisine de 4°C, dans un flacon en verre stérile fermé hermétiquement pour la préservation de l'air et de la lumière (en utilisant le papier d'aluminium) (Photo4).



Photo 4 : Quantité d'Huile essentielle recueillie dans des flacons

II.2.5. Détermination de 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. Matériel microbiologique

II.3.1. Origines des souches pathogènes testées

Les trois souches utilisées dans notre étude qui sont réalisés des germes responsables des infections intestinales et nosocomiales (Tab.4) ; il s'agit des :

- **Bactéries à Gram -** : *Pseudomonas aeruginosa*
- **Bactéries à Gram +** : *Staphylococcus aureus*
- **Levure** : *Candida albicans*

Tableaux 4 : La source de souches pathogènes testées

Les microorganismes		La source
Bactéries	<i>Staphylococcus aureus</i>	Laboratoire de microbiologie de l'hôpital d'Aintelles
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Laboratoire de microbiologies et biologie végétale
Levure	<i>Candida albicans</i>	Laboratoire de microbiologies et biologie végétale

Leur conservation est faite dans des tubes de gélose nutritive inclinée.

II.3.2. Matériel utilisé

A- Matériel

Le matériel utilisé au laboratoire pour l'étude microbiologique est le suivant : -Bain marie- - bec benzène - Pipette pasteur – Balance de précision –lamelle –microscope optique – papier pH - les tube à essai et à hémolyse et les boites de pétrie- les flacons- Papier whatman (Ø=6mm) – Ecouvillon.

Pour la méthode d'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation sur les feuilles de deux espèces végétales, le matériel utilisé est mentionné dans le tableau ci-dessous :

Tableau 5 : Le matériel réservé à l'hydro-distillation

Matériel	Utilisation
Appareil d'hydrodistillation de type Clevenger	Extraction des HES
Agitateur plaque chauffante	Préparation du milieu de culture
Réfrigérateur	Conservation des échantillons
Autoclave	Stériliser les matériels et les milieux de culture
Etuve réglée à 37C°	Incubation les souches bactériennes
Micropipette(500µl)	Préparation de microvolumes

B- Les Réactifs

Parmi les produits utilisés dans notre expérimentation sont :

- **les antibiotiques** : Gentamicine, Fosfomycine, Ciprofloxacine, Tobramycine, vancomycine , Imipenème ,cefatazidine, , Oxaciline .
- **Les antifongiques** :Econazole,Clotrinazole .
- **Les produits chimiques** :

Sulfate de sodium(Na₂SO₄).- Chlorure d'hydrogène(HCL)- Chlorure de sodium (NaCl)
-Diméthylsulfoxyde (DMSO)-Violet de gentiane phénique -Lugol (Iodo-iodure de potassium-
Alcool(Ethanol) (C₂H₅-OH).Safranine (ou Fuchsine phéniquée de ziehl).

C.-Les milieux de culture

Les milieux de culture que nous avons utilisés dans la partie microbiologique sont : Le Bouillon nutritif, Chapman, King A, King B, Sabouraud + Chloramphénicol, Gélosenutritive, Milieu Mueller Hinton.

II.4. Confirmation de l'identification des souches

II.4.1. Etude macroscopique

Cet examen est basé sur l'observation à l'œil nu ; l'aspect morphologique des colonies ; leur viscosité, le diamètre, la contour, le relief, la couleur des colonies le virage de la couleur des milieux chromogènes (indicateurs de pH : Exemple : Rouge de méthyle devient jaune .

II.4.2. Etude microscopique

II.4.2.1. 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**).

II.4.2.2. Test de 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 appelée catalase. Ce test est réalisé par une mise en contact entre une colonie bactérienne et une goutte d'eau oxygène (H_2O_2) (**CARBONNELLE *et al*. ; 1987**).

II.4.2.3. Teste d'oxydase

Ce test a pour but de déterminer la présence d'un cytochrome oxydase active en utilisant un substrat déterminé : N-diméthylparaphénylène diamine qui réagira en sa présence

par un changement de couleur. Quelques gouttes de ce réactif seront versées sur une colonie bactérienne et la lecture sera effectuée après quelques secondes (CARBBONNELLE *et al.* ; 1987).

II.4.3. Test spécifiques à *Candida albicans*

Des tests supplémentaires ont été réalisés pour identifier la levure *Candida*.

II.4.3.1. Test de blastes (Tube germinatif)

Ce teste permet l'identification de l'espèce *Candida albicans* en moins de 4 Heures. Décrit par Taschdjian en 1960 et inspiré des travaux de Reyndolds et Braune qui ont montré en 1956 que les constituants du sang favorisaient la formation de filaments par certaines levures. La souche à tester a été émulsionnée dans environ 0,5 ml de plasma réhydraté (CARDINALE, 2001).

II.4.3.2. Test de Chlamydosporulation

Le milieu que nous avons utilisé est un milieu minéral composé de : glucose, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5g/l) et agar (15g/l). Après l'ensemencement du milieu par *Candida* par des stries sérés, une lamelle a été déposée sur la gélose de la boîte de pétri pour être ensuite incubée 48h à 29°C (BARGADE SOUZA *et al.* ; 2010).

II.4.3.3. Croissance à 45°C

Ce test a été utilisé à partir d'une culture positive de 24 h de tube germinatif ou de Chlamydosporulation. Ce test de la température a été réalisé en utilisant le milieu YPA « Yeast Peptone de Dextrose » (10g extrait de levure, 8 peptone, agar 20g, 20g glucose, 1000ml d'eau distillée, Ph = $6,5 \pm 0,2$) ou SDA « Sabouraud dextrose agar » (annexe), la croissance a été évaluée quotidiennement pendant 10 jours. C'est un test utile pour différencier entre *Candida dubliniensis* (pas de croissance) et *Candida albicans* (croissance) (PINJONET *et al.* ; 1998).

II.5. Test d'Antibiogramme

L'antibiogramme permet de mesurer la capacité d'un antibiotique à inhiber la croissance bactérienne *in vitro*. 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 été ensemencées en surface sur gélose Mueller -Hinton en utilisant un écouvillon, les disques d'antibiotiques ont été ensuite déposés en surface du milieu ensemencé et incubé à 37 °C pendant 18 heures (COURVALLIN *et al.* ; 1985) (Fig10).

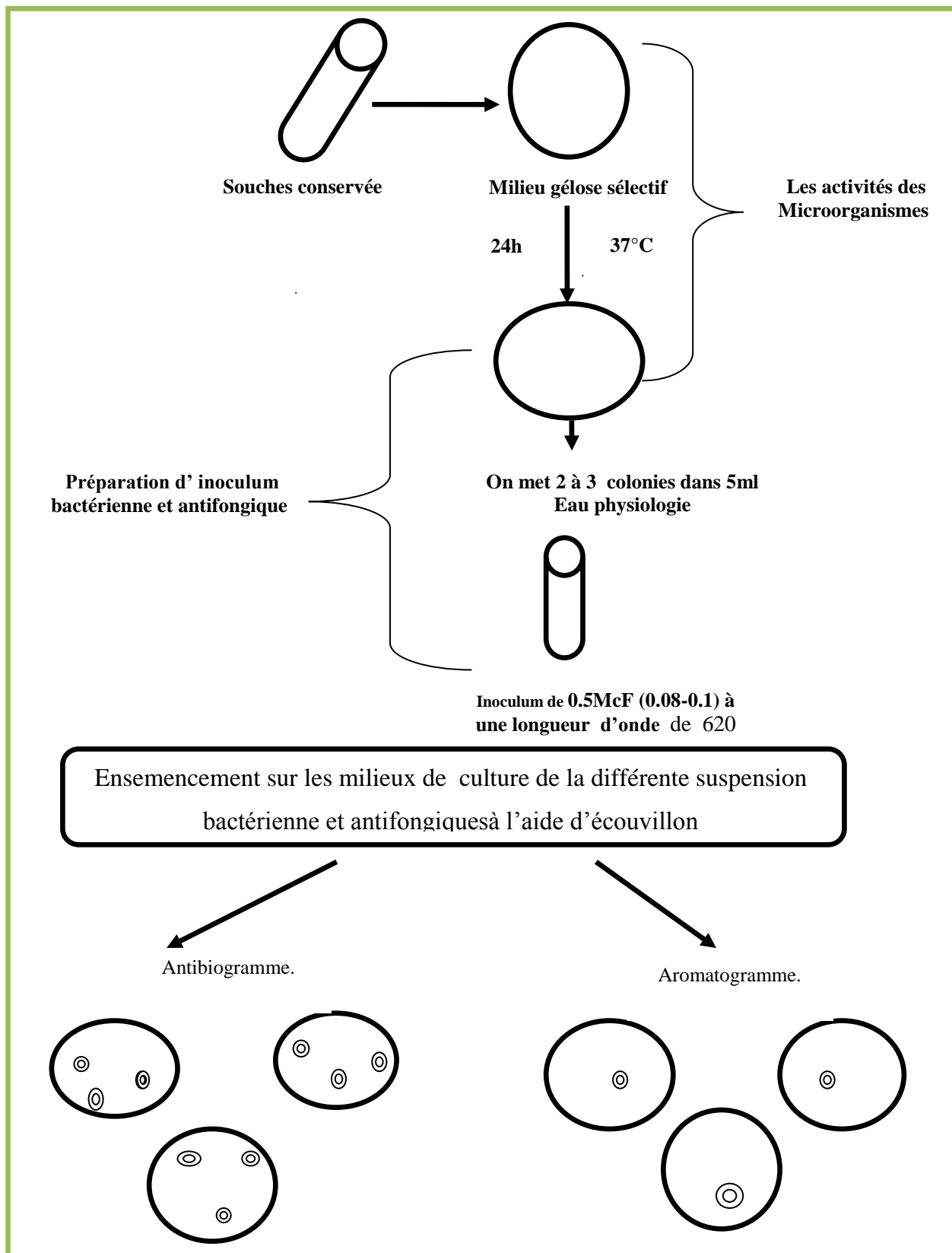


Figure 10: Schéma présente les étapes de l'antibiogramme et aromatoigramme

II.6. Test du pouvoir antibactérien et antifongique des HEs

II.6.1. Préparation des disques

Pour la réalisation de l'antibiogramme, les disques sont faits à partir du papier Wathman, ce dernier a été découpé en disque blanc de 6 mm. Après leur stérilisation au four pasteur pendant 20 mn à 160°C, les disques ont été imprégnés au paravent et placés dans des boîtes de pétri.

II.6.2. Préparation de l'inoculum microbien

A partir d'une culture jeune de 18 h pour les bactéries et de 48h pour les levures, nous avons préparé des suspensions mères et prélevant 3 à 4 colonies bien isolées et identiques, que nous avons déposés dans 5ml d'eau physiologique stérile puis agité au vortex.

La suspension de la concentration mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (0.5McFarland (0.08-0.1) /620 nm).

Les valeurs comprises dans les intervalles cités ci-dessus correspondent à une concentration optimale de 10^7 - 10^8 germes /ml. Si une des valeurs trouvée à la première lecture n'est pas comprise dans l'intervalle (supérieure à la valeur maximale), nous l'ajustons en ajoutant de l'eau physiologique (à 9% de NaCl) et si elle est inférieure à la valeur minimale nous ajoutons des colonies. A chaque fois une nouvelle lecture de transmittance est réalisée jusqu'à l'ajustement de la suspension aux valeurs désirées. L'inoculum doit être utilisé dans les 15 mm suivant sa préparation.

II.6.3. Les huiles essentielles utilisées

Pour l'étude de l'activité antimicrobienne, les huiles essentielles employées sont à l'état pur pour pouvoir les utiliser dans la technique de l'aromatogramme.

L'aromatogramme est basée sur une technique utilisée en bactériologie médicale, appelée antibiogramme (SATRANI *et al.* ; 2007, BENLILALI *et al.* ; 1986).

II.6.4. Dépôt des disques (2 disque /boite)

A l'aide d'une micropipette , nous prélevons 10 µl d'huile essentielle pur , que nous déposons chaque quantité prélevée sur le disque posé préalablement à l' aide d'une pince stérile sur la surface de la gélose de Mueller Hinton. L'ensemencement a été réalisé à l'aide d'écouvillon, ensuite on laisse diffuser pendant 30 min et enfin, incuber à 37 °C pendant 24h pour les bactéries et 37°C pendant 48h pour les levures .

Lecture des résultats

- ✓ Zones claires autour du disque : présence d'une activité inhibitrice des HEs
- ✓ Absence des zones claires autour du disque : pas d'effet inhibiteur des HEs

Expression des résultats

Les diamètres des zones d'inhibition lorsqu'elles existent ont été mesurés à l'aide d'un pied à coulisse.

II.7. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) sur milieu solide

II.7.1.Principe de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La CMI est définie comme étant la dernière ou la plus basse concentration d'un agent antimicrobien qui peut inhiber visiblement la croissance d'un micro-organisme après 24h pour les bactéries et 48 h pour les levures .

Le but est d'établir le niveau de sensibilité des pathogènes envers les agents antimicrobien en l'occurrence les HEs étudiées.

Cette CMI est déterminée selon la méthode des dilutions sur milieu gélose : MH pour les bactéries et les levures.

II.7.2. Préparation de l'inoculum microbien

A partir de culture jeune de 18 h pour les bactéries et 48 h pour la levure , nous préparons les solution mères des souches à étudier, dont la densité optique est ajustée à 0.5 McF (0.08-0.1) à une longueur d'onde de 620 nm ,à l'aide d'un spectrophotomètre.

II.7.3. Préparation des dilutions des huiles essentielles

Préparation une séries de dilution ,en prélevant 1,5 ml de la solution mère auquel on met dans un tube à hémolyse contient 1350 µl de DMSO stériles pour obtenir la dilution 10^{-2} , procédant de la même façon jusqu'à la dilution 10^{-7} .

L'huile essentielle est émulsionnée à raison de 10 % (DMSO) afin de disperser les composés et d'améliorer leur contact avec les microorganismes testés. Les dilutions ont été préparées à 10 %, 5 %, 2,5 %, 1,25 %, 0,625 %, 0,312 %,0.156 %,0.078 % ,0.039 % ,0.019 %,0.009 % et 0.004 % dans la solution de DMSO (fig.10). Un volume de 0,75 ml de chacune des dilutions est versé dans une boîte Pétri vide, sont ajoutés par la suite 6,75 ml du milieu MH préalablement stérilisé pendant 20 minutes à 120°C, refroidie à 45 °C, et on fait tourner les boîtes d'un mouvement circulaire jusqu'à l'obtention d'un milieu homogène. Les concentrations finales d'huile essentielle sont de l'ordre de 1 %, 0.5 %, 0.25 % ,0.125 %, 0.0625 %, 0.0312 %, 0.0156 %, 0.0078 %, 0.039 %,0.0019 %, 0.0009 % et 0.0004 %. Des contrôles négatifs ne contenant que le milieu de culture et le DMSO ont été également préparés.

Les boîtes préparées font l'objet d'un ensemencement des bactéries testées à l'aide d'une anse calibrée de 1µl (dont la densité des suspensions est ajustée de la même manière).

Après incubation à 37°C pendant 24-48 h. La concentration minimale inhibitrice (CMI) est représentée par les concentrations des boîtes qui ne contiennent pas de culture (Fig 11).

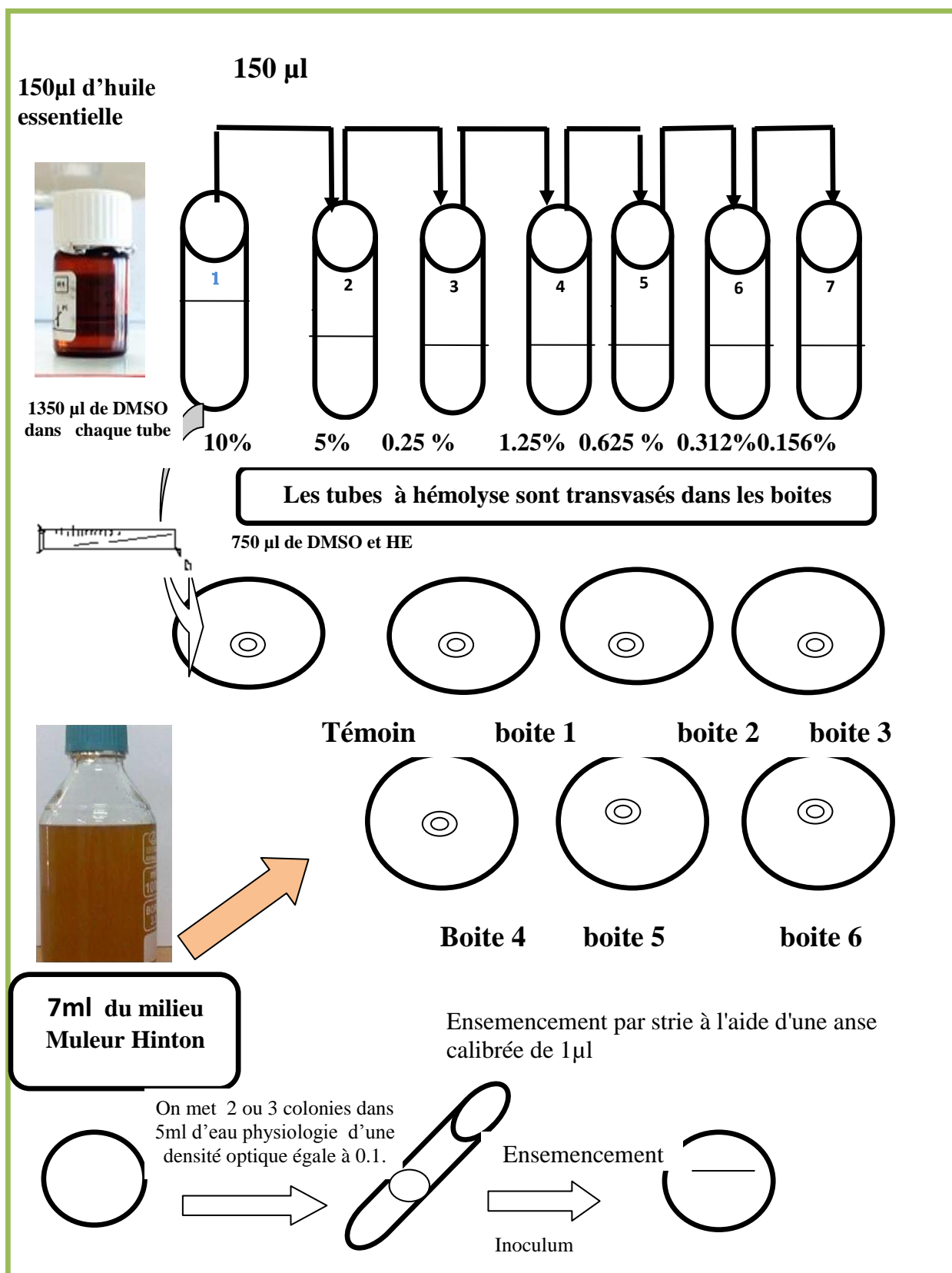


Figure 11 : Schéma présente la méthode de la détermination de la CMI



Résultats
Et
Discussion

Partie III : Résultats et discussion

III.1. Résultats d'extraction et rendement des huiles essentielles

Après l'extraction par la méthode d'hydrodistillation on a obtenue des quantités des huiles essentielles de deux plantes visibles. L'huile essentielle de *Salvia officinalis* L. de couleur jaune claire et l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* L. est de couleur jaune foncé et dont forte odeur est fraîches et agréable (**Photo 5**).

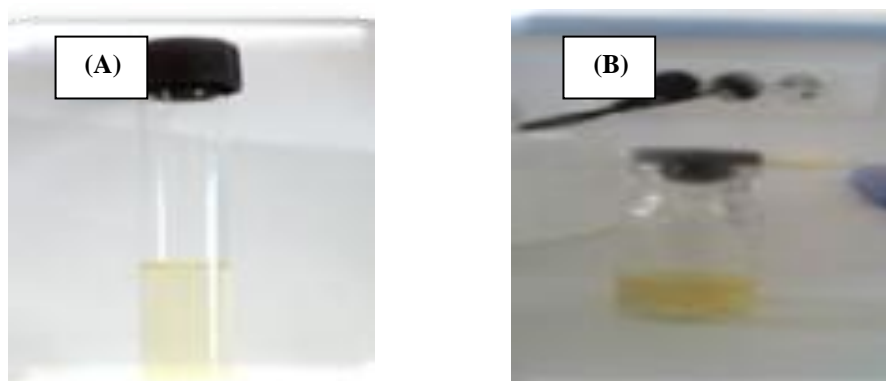


Photo 5 : Les huiles essentielles obtenues par l'hydrodistillation.

(A) : Les huiles essentielles de la sauge *officinalis Salvia officinalis* L.

(B) : Les huiles essentielles d'*Artemisia herba alba* L.

Nous rapportons dans le deux tableaux suivant la détermination des rendements des huiles essentielles M_{HE} en fonction de la quantité matière végétale de (*Salvia officinalis* L.) et (*Artemisia herba alba* L) et des volumes de l'eaux distillées utilisées.

Tableaux 6 : Détermination des rendements des huiles essentielles M_{HE} en fonction de la quantité matière végétale utilisée de (*Salvia officinalis* L) et les volume de l'eau distillées

	Masse de matière végétale $m M_V$ (g)	Masse d'huiles essentielle M_{HE} (g)	Eau distilles utilises mL
R₁	200	0,5	1500
R₂	200	0,6	1500
R₃	200	0,52	1500

$$R_1 = M_{HE} / m M_V * 100 = 0.5/200 * 100 = 0.25\%$$

$$R_2 = M_{HE} / m M_V * 100 = 0.6/200 * 100 = 0.30\%$$

$$R_3 = M_{HE} / m M_V * 100 = 0.52/200 * 100 = 0.26\%$$

La détermination de rendement totale des huiles essentielles de La Saugé officialis (*Salvia officinalis .L*).

$$R = \frac{\sum(R_1 + R_2 + R_3)}{3} = \frac{\sum(0.25 + 0.6 + 0.26)}{3} = 0.27\%$$

Tableau 7 : La détermination de rendement avec la quantité des huiles essentielle M_{HE} et la quantité en matière végétale utilisée de *Artemisia herba alba* et les volume d'eau distilles utilisée

	Masse de matière végétale $m M_V$ (g)	Masse d'huiles essentielles M_{HE} (g)	Eau distilles utilises (mL)
R₁	200	0.74	1500
R₂	200	0.78	1500
R₃	200	0.81	1500

$$R_1 = M_{HE} / m M * 100 = 0.74/200 * 100 = 0.37\%$$

$$R_2 = M_{HE} / m M_V * 100 = 0.78/200 * 100 = 0.39\%$$

$$R_3 = M_{HE} / m M * 100 = 0.81/200 * 100 = 0.41\%$$

La détermination du rendement total des huiles essentielles d'*Artemisia herba alba L.*

$$R = \frac{\sum(R_1 + R_2 + R_3)}{3} = \frac{\sum(0.37 + 0.39 + 0.41)}{3} = 0.39\%$$

III.2. Testes microbiologiques

III.2.1. Etude macroscopique

Pseudomonas aeruginosa

L'observation macroscopique a montré que les colonies des *Pseudomonas aeruginosa* ayant une forme plate, opaque, de couleur régulière et parfois irrégulière, avec un aspect de pigmentation jaunâtre présente dans le milieu **king B** et bleu-vert dans le milieu **king A** (Photo 6).

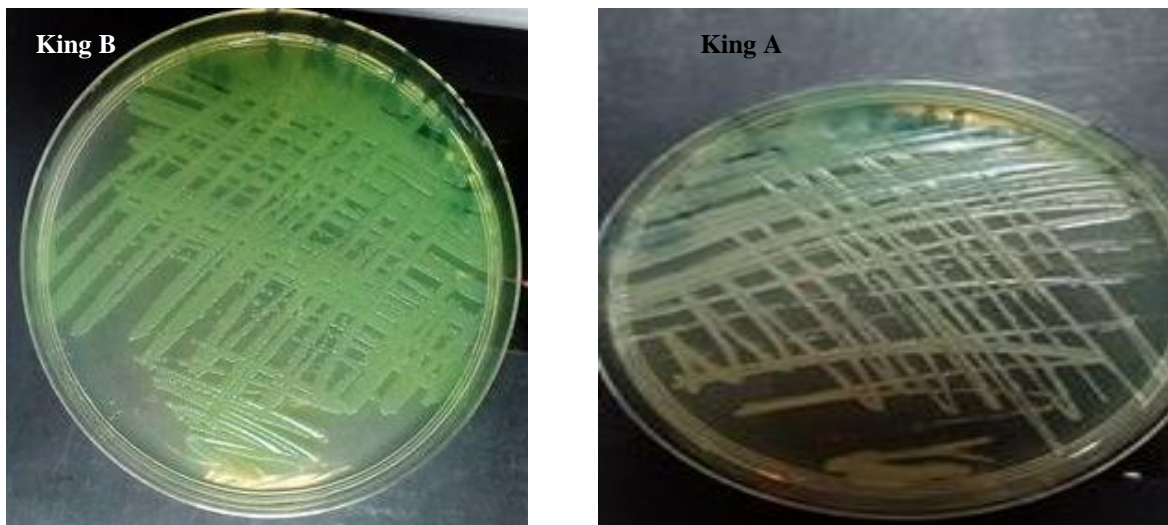


Photo 6 : Aspect macroscopique de *Pseudomonas aeruginosa* ensemencée sur milieu King B et King A.

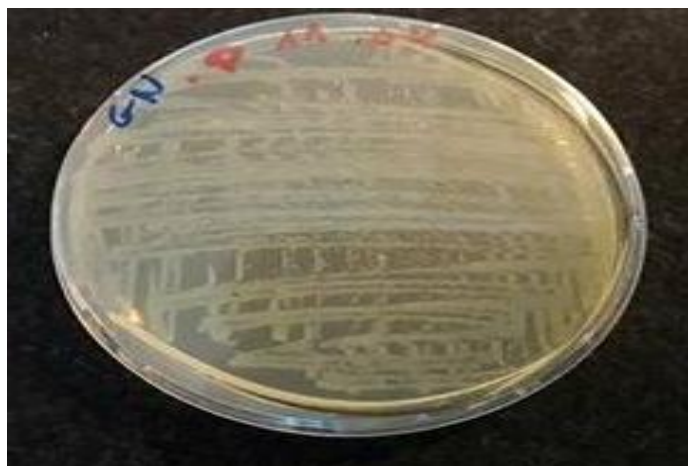


Photo 7 : Aspect macroscopique de *Pseudomonas aeruginosa* ensemencée sur milieu Gélose Nutritive.

Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus sur milieu Chapman apparaît de couleur blanchâtre crémeuse et de bordure régulière de 2 à 3 mm de diamètre avec un virage de couleur vert le jaune – orange (**Photo 8**) 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 9**).



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

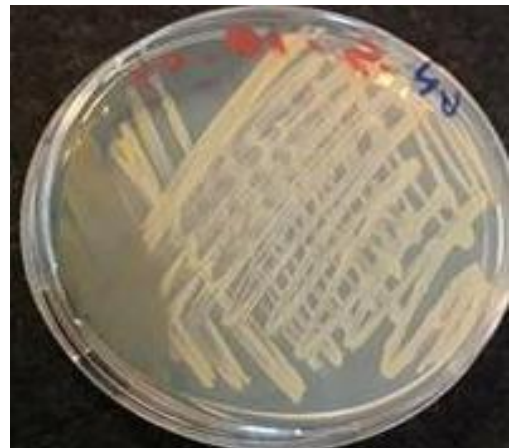


Photo 9: Aspect macroscopique de *Staphylococcus aureus* ensemencée sur milieu de Gélose Nutritive

Candida albicans

La croissance de *candida albicans*, sur milieu sabouraud a donne des colonies rondes, de couleur blanches, crémeuses, lissées et opaques (**Photo 10**).

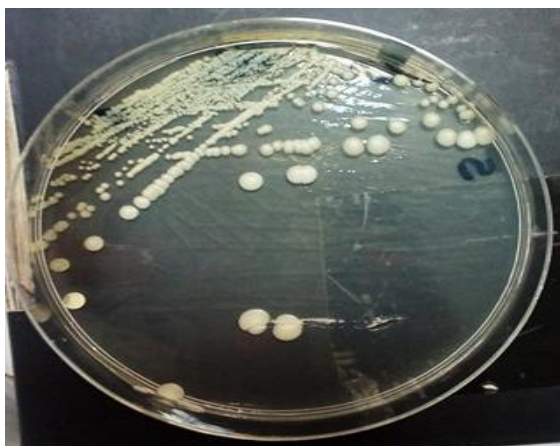


Photo 10 : Aspect macroscopique de *candida albicans* ensemencée sur milieu de Sabouraud Chloramphenicol.



Photo 11 : Aspect macroscopique de *Candida albicans* ensemencée sur milieu de Gélose Nutritive

III.2.2. Etude microscopique

III.2.2.1. 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 grams positif. Les observations ont été obtenues avec un grossissement de 100 X.(voir **Photo 12,13,14**)

Pseudomonas aeruginosa

L'observation microscopique des bactéries après la coloration de Gram de frotis réalise à partir des cultures purifiés a montre que la souche de *Pseudomonas aeruginosa* apparaient sous forme de bacille soit en diplopacile , à à couleur rose de Gram négatif (**Photo 12**).

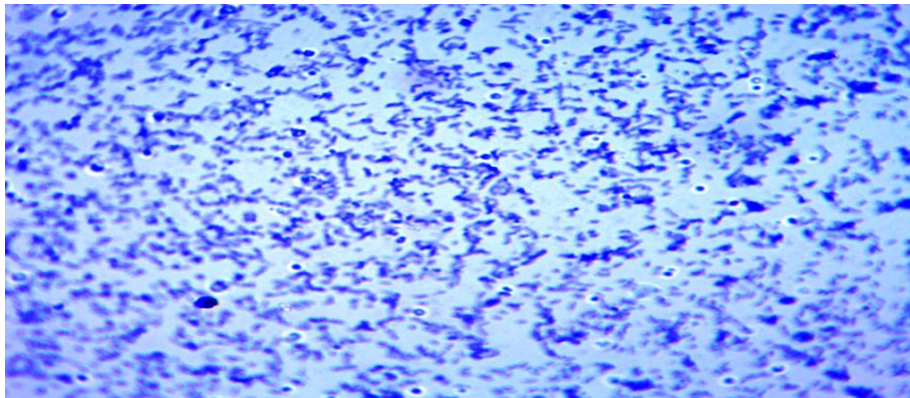


Photo 12: Observation microscopique de *Pseudomonas aeruginosa* après coloration X100. (Gram négatif).

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 (**Photo 12**)

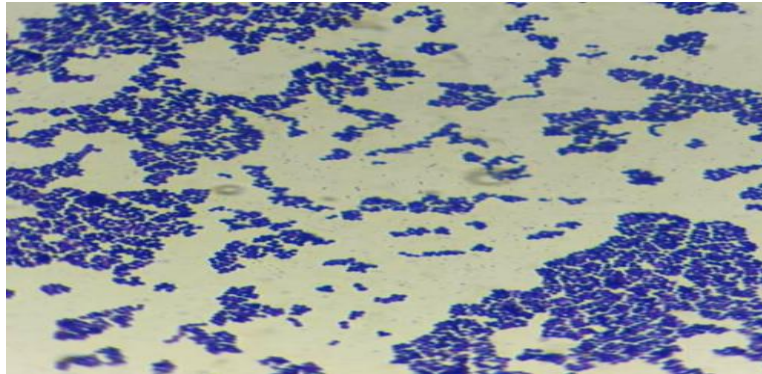


Photo 13: Observation microscopique de *Staphylococcus aureus* après coloration X100. (Gram positif)

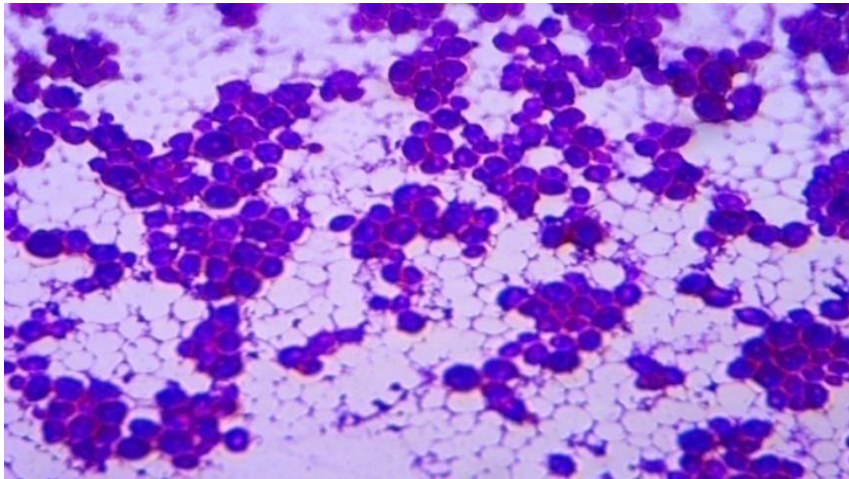
Candida albicans

Photo 14 : Observation microscopique de *Candida albicans* après coloration X 100 (Gram négatif)

L'observation microscopique de la souche *Candida albicans*, fait apparaître des cellules des formes sphériques ou ovoïdes ; avec une reproduction végétative qui se fait par bourgeonnement monopolaire et bipolaire (**Photo 15**).

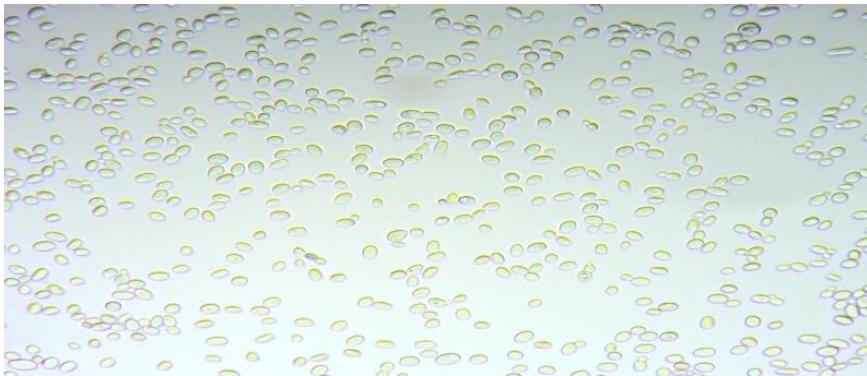


Photo 15 : Observation microscopique de *Candida albicans* à l'état frais

III.2.2.2. Test de *Chlamydosporulation*

La souche sélectionnée, montre une filamentation de type pseudomycélienne et semble être dépourvue de formes bien définies de spores sexuées (**Photo 16**).

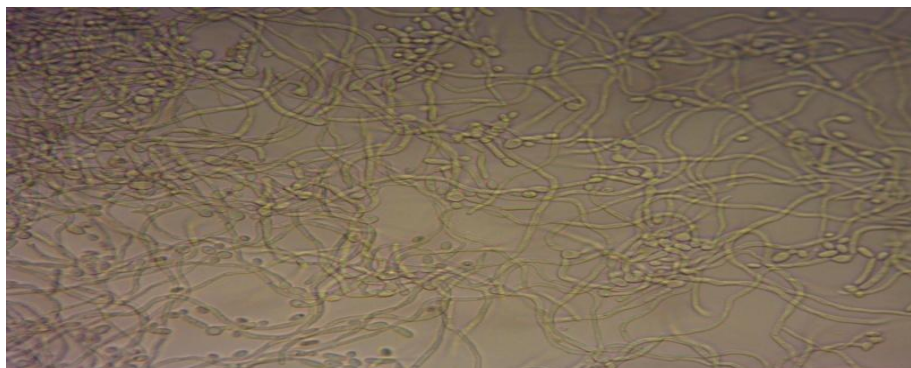


Photo 16 : Observation microscopique de Test de *Chlamydosporulation* de *Candida albicans* sur milieu minéral

III.2.2.3. Test catalase

L'addition d' H_2O_2 sur les colonies de *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* a révélé un dégagement de gaz sous forme de bulle qui indique la présence de la catalase chez les deux isolats (photo 17,18).



Photo 17 : Résultat du test catalase positif de *Pseudomonas aeruginosa*



Photo 18 : Résultat du test catalase positif de *Staphylococcus aureus*

III.2.2.4. Test de L'oxydase

La coloration violet qui apparue en quelques secondes, révèle une réaction positif (Photo19,20).



Photo 19 : Résultat du test oxydase positif de *Pseudomonas aeruginosa*



Photo 20 : Résultat du test oxydase négatif de *Staphylococcus aureus* .

III.2. Test d'antibiogramme

Les résultats d'antibiogramme obtenus sont résumés dans les tableaux et les Figure : 12, 13,14 , Photo : 21,22 ,23.

La sensibilité ainsi que la résistance des bactéries testées aux différents antibiotiques sont représentées dans la Photo 21,22.



Photo 21: Effet des antibiotiques sur la croissance de trois souches *Sstaphylococcus aureus* sur milieu Mueller Hinton.

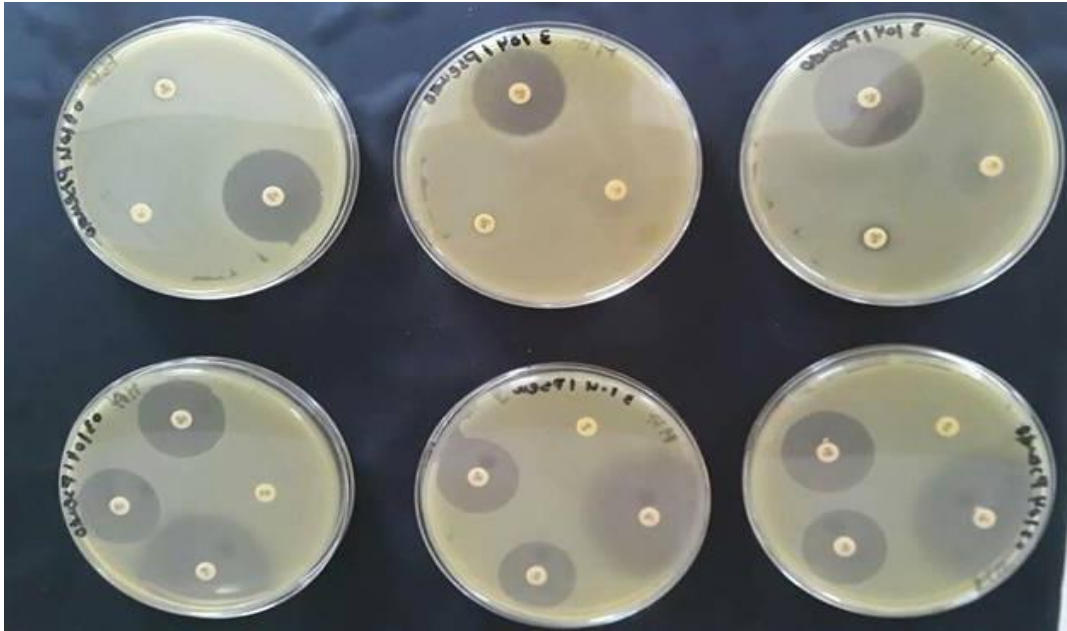


Photo 22 : Effet des antibiotiques sur la croissance de trois souches de *Pseudomonas aeruginosa* sur milieu Mueller Hinton.

La sensibilité ainsi que la résistance de levure testées avec deux antifongiques testes sont représentées dans la **Photo 23**.

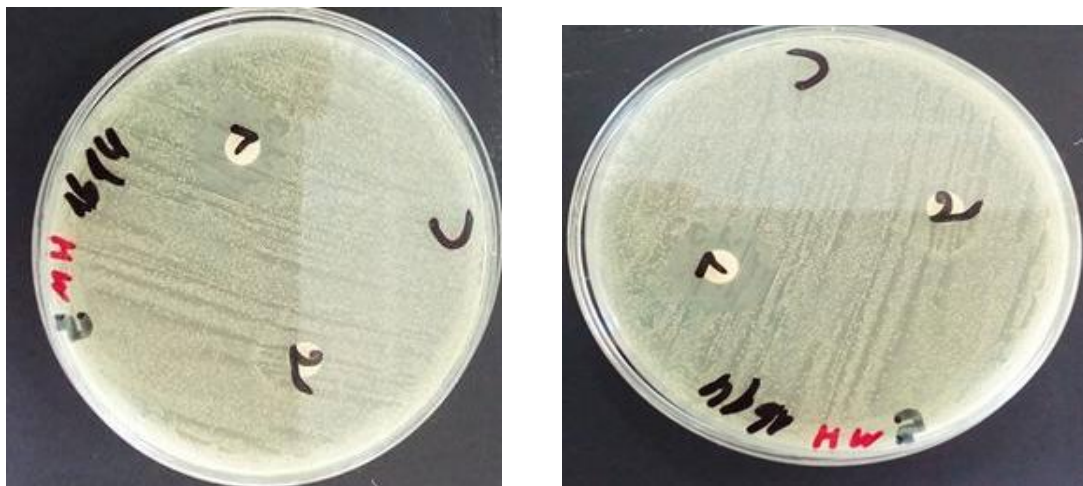


Photo 23 : Effet des antifongiques sur la croissance de deux souches de *Candida albicans* sur milieu Mueller Hinton.

III.3.1. L'effet des antibiotiques sur la croissance de *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) 30,67 mm (Tableau 8).

Tableau 8 : 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.

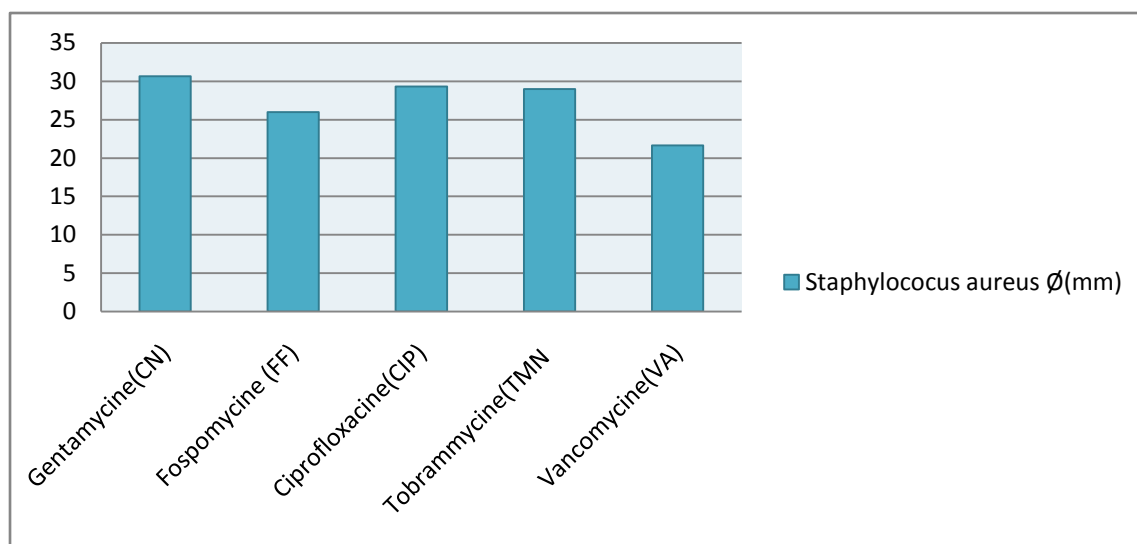


Figure 12 : Représentation graphique des diamètres d'inhibitions de *Staphylococcus aureus*. vis-à-vis des différents antibiotiques (Gentamycine(CN), Fospomycine (FF), Ciprofloxacine(CIP), Tobrammycine(TMN), Vancomycine (VA)).

III.3.2. L'effet des antibiotiques sur la croissance de *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 29,6 mm respectivement, par contre la Fosfomycine (FF), Ceftazidim (CAZ) et l'Oxacilline (OX) n'ont manifesté qu'une faible activité (**Tableau 9**).

Tableau 9 : Résultats de l'antibiogramme de *Pseudomonas aeruginosa*.

Antibiotique	Diamètre critique (mm)			<i>P.aeruginosa</i>	
	R	I	S	Ø(mm)	Résultat
Fospomycine (FF)	<16	-	>16	6	RN
Tobrammycine (TMN)	<16		>16	26,67	S
Gentamycine (CN)	<17		>17	25	S
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

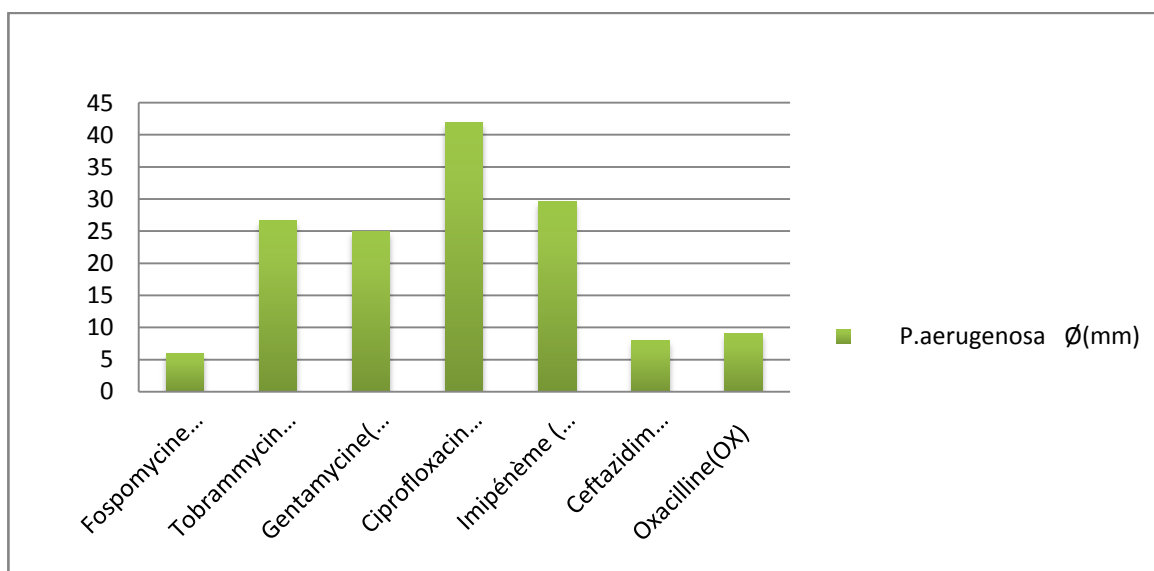


Figure 13 : Représentation graphique des diamètres d'inhibitions de *Pseudomonas aeruginosa* vis-à-vis des différents antibiotiques (Fospomycine (FF), Tobrammycine (TMN), Gentamycine (CN), Ciprofloxacine (CIP), Imipénème (IPM), Ceftazidim (CAZ), Oxacilline (OX)).

III.3.3. L'effet des antibiotiques sur la croissance de *Candida albicans*

Nous avons constaté que l'antifongique Econazole 1% a une activité importante que celui de Clotrinazole 1% respectivement 19 mm contre 6 mm. Cela explique que se dernier ce montre résistant (**Tableau 10, et Figure 14**)

Tableau 10: Résultats de l'antibiogramme de *Candida albicans*

Antifongique	Candida albicans	
	Ø	Résultat
Econazole 1%	19	S
Clotrinazole 1%	6	R

S : Sensible, R : Résistant.

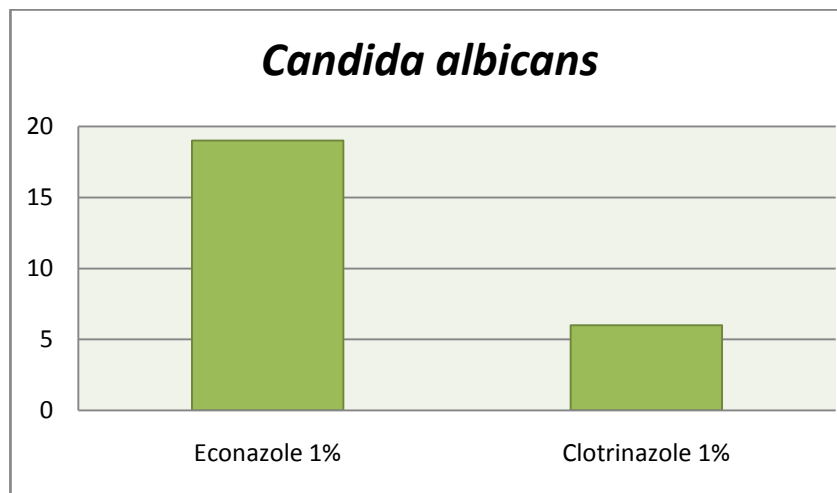


Figure 14 : Représentation graphique des diamètres d'inhibitions de *Candida albicans* vis-à-vis de deux antifongiques différent (Econazole, Clotrinazole).

III. 4. Résultats du test du pouvoir antibactérien et antifongique

Résultats de l'aromatogramme

L'activité antibactérien d'huile essentielle de sauge *officinalis* (*Salvia officinalis* L.) et *Artemisia herba alba* est évaluée sur trois germes pathogènes d'origine hospitalière (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*) après 24 heures d'incubation à une température adéquate de 37°C.

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



Photo 24 : Effet de l'huile essentielle des feuilles sèches de *la sauge* (*Salvia officinalis* L.) sur la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* [1] et *Staphylococcus aureus* [2] et *Candida albicans* [3] sur milieu Mueller Hinton



Photo 25 : Effet de l'huile essentielle des feuilles sèches de *Artemisia herba alba* L. sur la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* [1] et *Staphylococcus aureus* [2] et *Candida albicans* [3] sur milieu Mueller Hinton

Tableau 11: L'effet antimicrobien des huiles essentielles d'*Artemisia herba alba* L. et *Salvia officinalis* L. sur *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* et sans utilisation de substances émulsifiantes

Microorganisme	Diamètre des zones inhibitrices d' <i>Artemisia herba alba</i> (mm)	La Sensibilités	Diamètre des zones inhibitrices de <i>Salvia officinalis</i> L. (mm)	La Sensibilités
<i>Staphylococcus aureus</i>	9	Sensible (+)	9	Sensible (+)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8	Sensible (+)	6	Non sensible (-)
<i>Candida albicans</i>	47	Extrêmement sensible (+++)	10	Sensible (+)

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

D'après les résultats mentionnes dans le tableau 15 ci-dessous, nous avons pu tracer l'histogramme de comparaison suivant :

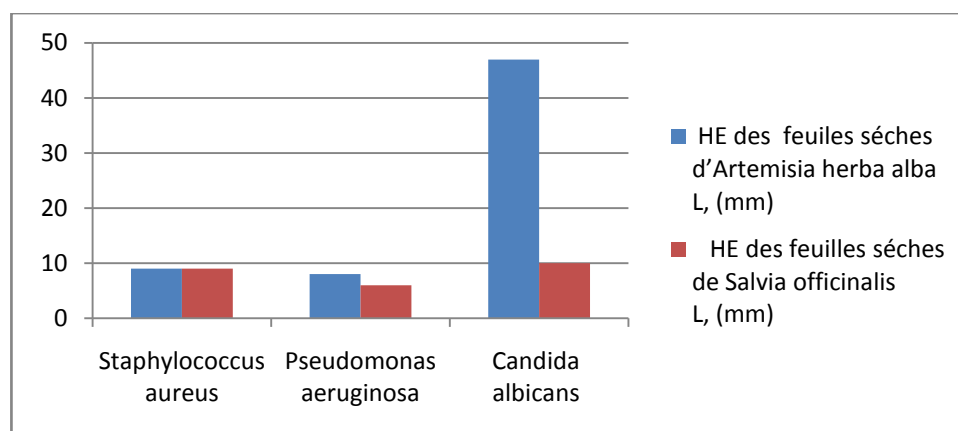


Figure 15 : Histogramme de comparaison des zones d'inhibition

D'après le **tableau 11** et la **Figure 15**, nous constatons facilement que l'huile essentielle des feuilles sèches d'*Artémisia herba alba* une très bonne activité si on la compare avec l'huile essentielle *Salvia officinalis L.* Tous les résultats de l'aromatogramme (diamètres des zones d'inhibition en mm).

III.6. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) sur milieu solide

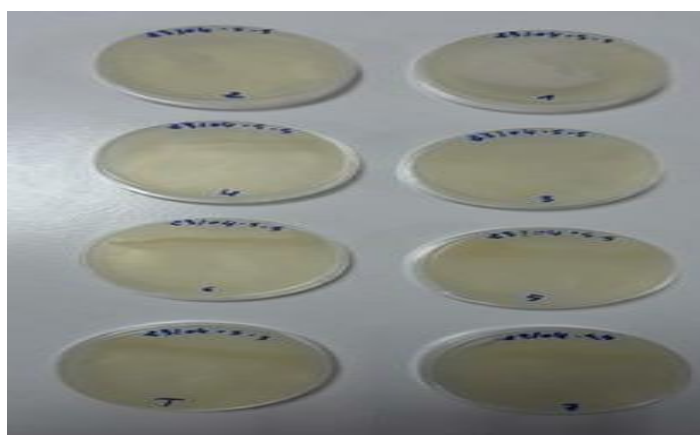


Photo 26 : Concentration minimale inhibitrice d'huile essentielle des feuilles sèches de *la sauge* (*Salvia officinalis L.*) sur la croissance de *Staphylococcus aureus* sur milieu Mueller
Exacte boîte 2

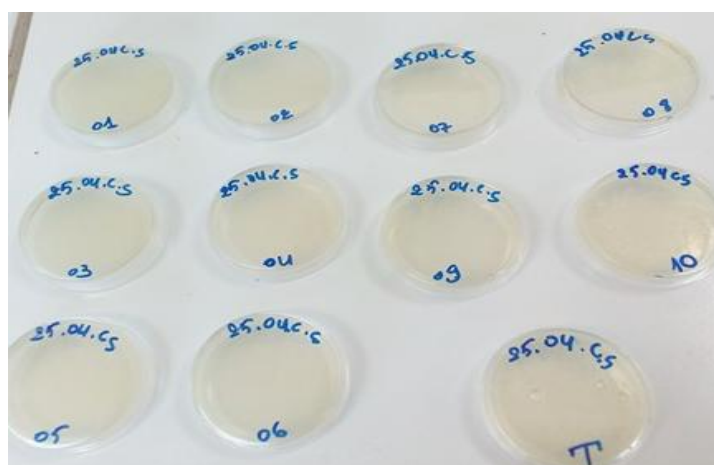


Photo 27: Concentration minimales inhibitrices d'huile essentielle des feuilles sèche de *la sauge* (*Salvia officinalis L.*) sur la croissance de *Candida albicans* sur milieu Mueller Exacte boîte 7

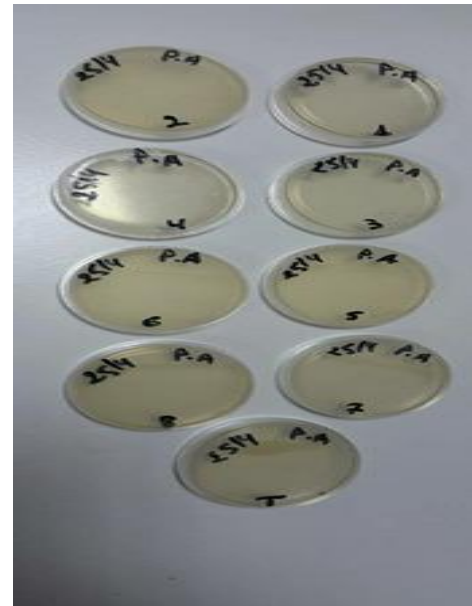
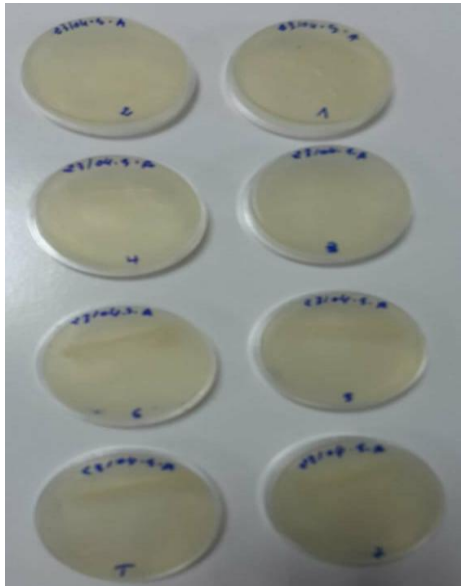


Photo 28 : Concentration minimale inhibitrice d’huile essentielle des feuilles sèches *Artemisia herba alba* sur croissance *Staphylococcus aureus* sur milieu Mueller Hinton. Exacte boîte 3.

Photo 29 : Concentration minimale inhibitrice d’huile essentielle de feuilles sèches *Artemisia herba alba* sur la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* sur milieu Mueller Hinton . Exacte boîte 4

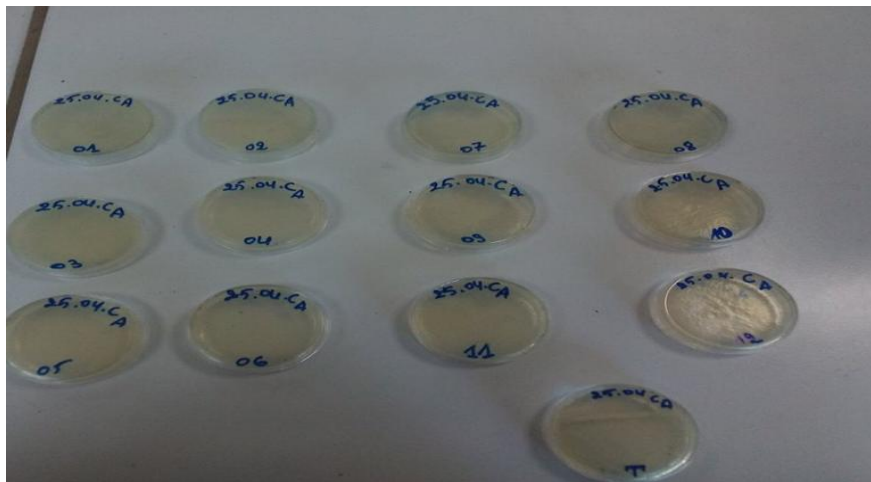


Photo 30 : Concentration minimales inhibitrices d’huile essentielle des feuilles sèches *Artemisia herba alba* sur la croissance de *Candida albicans* sur milieu Mueller Hinton .Exacte boîte 11.

Nous rapportons dans **le tableau 12** la concentration minimale inhibitrice sur milieu solide des huiles essentielles de *Salvia officinalis* et *Artemisia herba alba*.

Tableau 12 : Concentration de CMI des huiles essentielles de deux plantes aromatiques sur les souches testent.

Concentration %	<i>Salvia officinalis L.</i>		<i>Artemisia herba alba L.</i>		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Candida albicans</i>
1	-	-	-	-	-
0.5	-	-	-	-	-
0.25	+	-	-	-	-
0.125	+	-	+	-	-
0.0625	+	-	+	+	-
0.0312	+	-	-	+	-
0.0156	+	-	-	+	-
0,0078	/	+	/	+	-
0,0039	/	+	/	/	-
0,00195	/	+	/	/	-
0,00098	/	/	/	/	-
0,00049	/	/	/	/	+

La CMI enregistré pour l'huile essentielle de *Salvia officinalis* et DMSO sur *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans* sont respectivement de 0.5%, et 0.0156%.

La CMI enregistré pour l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* et DMSO sur *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans* sont respectivement de 0,25 % , 0.1.25 % ,0.00098 %.

III.7. Discussion

III.7.1. 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 % et celui d'*Artemisia herba alba* a été voisin de 0,39 %. 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 après 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.7.2. Pouvoir d'activité antimicrobienne (antibactérien 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/ *Artemisia herba alba* vis-à-vis des bactéries et moisissures testées. la souche de *Staphylococcus aureus* est sensibles et *Candida albicans* est extrêmement sensible à l'huile essentielle des les feuilles sèches d'*Artemisia herba alba* mais très résistant à la souche de *Pseudomonas aeruginosa* . Par rapport la comparaissant avec la plante de L'huile essentielle des les feuilles sèches *Salvia*

officinalis L. est très sensible à *Candida albicans* un peu sensible à *Staphylococcus aureus* mais très résistant à la souche de *Pseudomonas aeruginosa* .

Ces résultats ont montré que *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans* était plus sensible que *Pseudomonas aeruginosa* .

Cette sensibilité plus marquée des gram+ par rapport aux Gram négatif vis a vis des HEs a été déjà observée dans plusieurs étude 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.7.3.Détermination de concentrations minimales inhibitrices (CMI) sur milieu solide

L'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* en association avec DMSO, *in vitro*, révèle une bonne activité inhibitrice vis-à-vis les bactéries et levures testées par contre L'huile essentielle de *Salvia officinalis* L. il en moins.

Des tests de l'activité antibactérienne évaluée, il ressort que les huiles essentielles d'*Artemisia herba alba* L. sont très efficaces contre toutes les bactéries testées et plus particulièrement à la concentration 0.025 % et 0.0125 respectivement chez *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*. Les meilleurs résultats sont constatés envers la souche *Candida albicans* pour 0.00098 %.

La concentration de l'huile essentielle de *Salvia officinalis* L. égale ou supérieure à 2% a été insuffisante pour arrêter la croissance des bactéries et levures testées.

En 1999, HAMMER *et al.* ont effectué une étude qui portait sur l'activité antimicrobienne de 47 huiles essentielles contre 10 microorganismes dont une levure (*Candida albicans*), tous les microorganismes sont inhibés par les huiles essentielles de *Cymbopogon citratus*, *Origanum vulgare* et de *Pimenta racemosa* à des concentrations inférieures ou égales à 2 % par contre, ces microorganismes ne sont pas inhibés par l'huile essentielle de *Salvia officinalis* à la concentration de 2 %.



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 ?

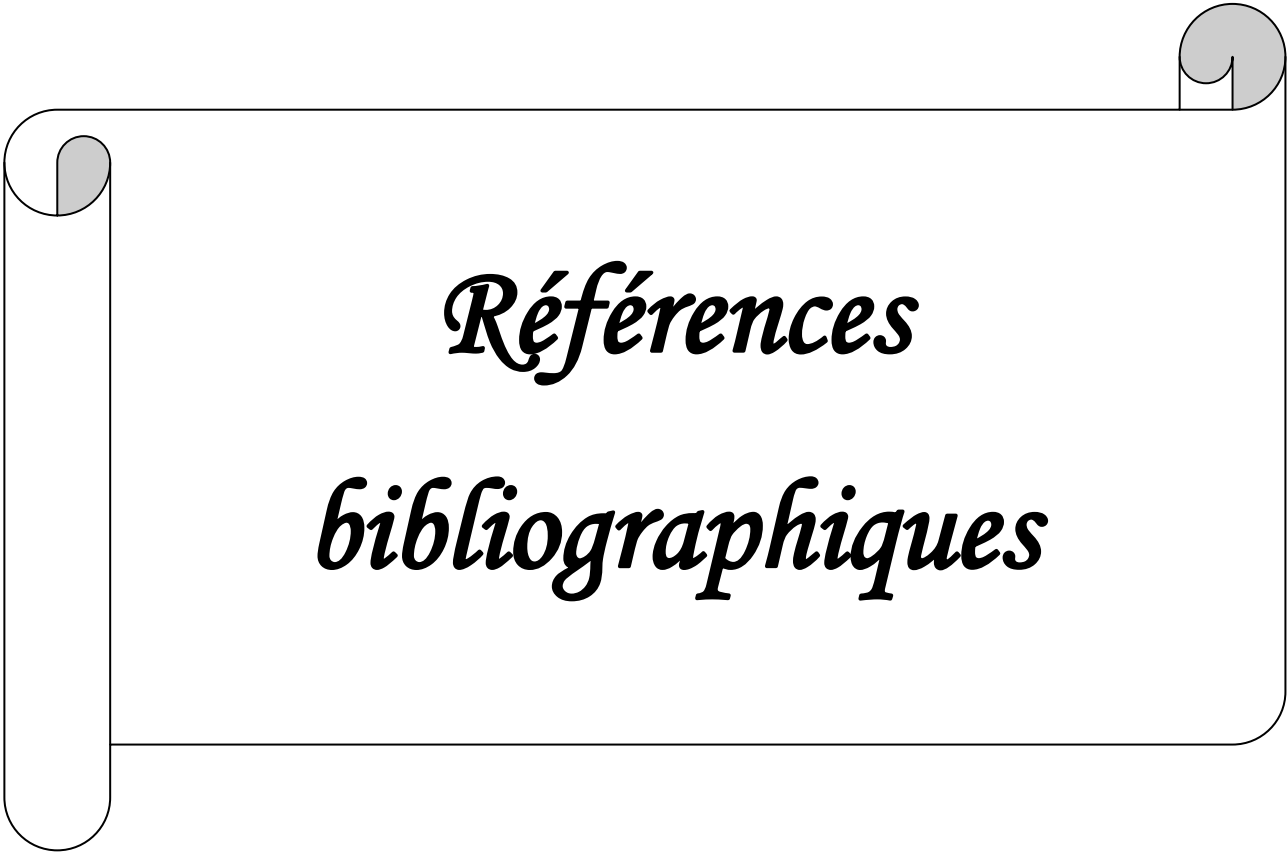
L'être humain recherche dans son environnement de quoi soulager ses maux et traiter ses blessures. La médecine moderne occidentale a rejeté la plupart de ces recours pour développer des médicaments chimiques et une technique de soins sophistiquée. Elle continue cependant d'utiliser certains remèdes à 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

Conclusion

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'hydrodistillation à partir de deux plantes aromatiques : *Artemisia herba alba* et *Salvia officinalis*. Cette dernière et d'après nos résultats obtenus s'est montré plus efficace vis-à-vis des microorganismes pathogènes.



*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

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^o Cycle, Université Cadi Ayyad, Fac. Sciences Marrakech, p304.
- AGBO-GODEAU S. et GUEDJ A., 2005** : Mycoses buccales. *EMC-Stomatologie* 1:p30-41.
- AUDIGIE C.L., DUPON G. et ZONSGAIN F., 1995** : Principes des méthodes d'analyse biochimique. T1, 2^{ème} 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 *Rev. Prat.* (Paris) 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** : Maîtrise 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., BENYUCEF M., DESJOBERT J.M.D.A.F. 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.

Références bibliographiques

- 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 hydro thermomécanique 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 avancées multiples. *Option/Bio* 238 : 4-5
- BONN. et BLANC J.M., 2008** : Annales de dermatologie et vénérologie, 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 (*Ajugaiava*, *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.
- 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. et CHAABOUNI 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 J.V., 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 Fungal Research* 1 : p 30-34.
- BRUNETON J., 1999** : Pharmacognosie, Photochimie. Plantes médicinales Edition technique et documentation, 3^e édition Lavoisier, Paris p 1120.
- BRUNETON J., 2005** : Pharmacognosie, Photochimie. Plantes médicinales. 3^e édition 2005. Editions & 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 p 1445. Base documentaire : Techniques d'analyse. Vol ; papier TA2.

Références bibliographiques

- CARBONNELLE B., DENIS F., MARMONIER A., PINON G. and VARGUES R., 1987** : bactériologie médicale. Technique Usuelle p14, 133 et 416.
- CARLES. et PHARM., 2003** : Les antifongiques dans le traitement des infections invasives. *Pharmactuel* 36(1): p25-41.
- CARRE P., 1953** : Précis de technologie et de chimie industrielle. T3. Ed. Ballière JB. et fils
- CORNELIS P. et PSEUDOMONAS., 2008** : Genomics and Molecular biology (1 st éd).
- COLINE W. et WRIGHT., 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). Boca Raton : 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., COSTA J. 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** : Organisation et Classification des plantes vasculaires, édition S.E.D.E.S, tome I, 1967.
- ERNEST J., JOSEPH L. et EDWARDS., 1973** : Microbiologie médicale. Paris, France p 302-303.
- FAUCHERE J.L. et AVRIL J.L., 2002** : Bactériologie générale et médicale P : 368.
- FEIGIN. et CHERRY. , 2004** : Text book of paediatric infectious diseases, 5th Edition, V.B. Sanders company. Canada.
- FERHAT M.A., MEKLATIB. Y. and CHEMAT F., 2007** : Comparison of different isolation methods of essential oil from Citrus fruits cold pressing, hydrodistillation and microwave « Dry » distillation. *FLAVOUR & FRAGR. J.* 22/ p 494-504.
- FIGARELLA J. et LEYRAL G., 1998** : Microbiologie techniques : 2, Documentation technique. 2ème édition - Biologie technique. Bordeaux: p 255.
- FRANCE-IDA J., 1998** : Comment s'assurer de la pureté d'une huile essentielle, Info – essences. p7 : 1-2.
- FRANCHOMME P. et PENOEL D., 1990** : Matière médicale aromatique fondamentale (317-406), livre quatrième, 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 : p49- 49.
- GHASEMI., PIRBALOUTI A., RAHIMI E. and MOOSAVI S. A., 2010** : Antimicrobial activity of essential oils of three herbs against *Listeria monocytogenes* on chicken frankfurters. *Acta agriculturae Slovenica*, 95(3), p 219 - 223.
- GUARRERA P. M., 1999** : Traditional antielmintic, antiparasitic and repellent 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** : Virucidal effects of the steam distillate from *Houttuynia cordata* and its components on HSV-1, influenza virus and HIV. *Planta Medica*, 61, p237-241.

Références bibliographiques

- HOHMANNJ., REDEID., MATHEA I. and BLUNDEN G., 2003** :Phenylpropanoid glycosides and 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 crude alcoholic extracts of *Artemisia annua*, *A. absinthium*, *A. siminatriloba*, and *Fumaria officinalis*. *Trematocidal plant alcoholic extracts. Parasitol Res*(2011) 109:p1585–159.
- KALEMBA D. and KUNICKA A., 2003** :Antibacterial and antifungal properties of essential oils "Review". *Curr. Med. Chem*, 10, p813-829.
- KAMATOU G. 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. , BEHRAMIFARN . , SEFIDKOM F. and REZA P. IMORADEIM., 2005** : Comparison of essential oils compositions of *Ferula aassa –Foetida* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. *Food Chemistry*, 91 : p 639-644.
- KIM J., MARSHALL M. R. and WEI C., 1995** :Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne 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'*Ammoides pusilla* et de *Magydarispastinacea*. 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 threethyme essential oils. *Riv. Ital. EPPOS*, 13, p 13-19.
- LEGRAND G., 1993** : Manuel de préparateur en Pharmacie, Masson, Paris.
- LOUP, 1991** : Bactériologie, technique en bactériologie chimique 2eme édition, P135, 137.
- LUCCHESIM. E., 2005** : *Extraction Sans Solva* ont Assistée par micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles, 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.
- MADIGAN M. et MARTINKOJ., 2007** : Brock-Biologie des micro-organismes. 11^{ème} édition. Pearson Education. France. p 1047.
- MANGENA T. and MUYINA N.Y.O., 1999** :Comparative évaluation of the antimicrobial activities of essential oils of *Artemisia afra*, *Pteronia incana* and *Rosmarinus officinalis* on selected bacteria and yeast strains *Lett .Appli Microbial.* 28, p 291-296.
- MARCHAL N., BOURDON J. L. et RECHARDC., 1987** : Les milieux de cultures pour l'isolement et identification biochimique des bactéries ; troisième édition remaniée Paris France

Références bibliographiques

- MATTEUCCIE.and GIAMPIEL., 2008** : Proposal open for discussion : defingared diagnostic procedures in experiment al diabetesresearch. J EthoPharmacol, 115 : p 163-72
- MEYER A., DEIANA J. et BERNARD A., 2004** : Biosciences et techniques.EditionDOIN. France. p304.
- MESSAIL L ., 2011** : étude phytochimiqued'une plante medicinale de l'est algerien(artemisia herba alba).Thèse Doctorat : Chimie Organique. Contstantine : université de Mentouri,p 104.
- MILADINOVIC D. and MILADINOVIC L J., 2000** : Antimicrobialactivity of essential oilofsagefromSerbia. Series:Physics, Chemistry and Technology 2000; 2(2): p 97 - 100.
- MOHAMEDA.H., EL-SAYEDM.A. and MOHAMEDN.S., 2010** : Chemicalconstituentsandbiologicalactivities of *Artemisia herba alba*. Records of naturalproducts; 4: p 1-25.
- MULTONJ L., 2002** : Additifs et auxiliares 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 phytochemicalstudies of bioactive components fromextracts of *rosmarinusofficinalis*L. A thesissubmitted 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. etSOTTO A., 2002** : Infection nosocomiales etmédecine physique et de réadaptation .Paris . France, p2.
- 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 médicinale et vétérinaire, systématique bactérienne, 2^{ème}édition,Masson.
- PINJON E., SULLIVAN D., SALKIN L., SHANLEY D.and COLEMAN D., 1998** : Sample,inexpensive, reliablemethod for differentiation of *Candidadublinsiensis*from *Candida albicans*, p77.
- PFALLER M A., 2002** : Focus on fungalinfectious 3.Phonix 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.andROURA S.I., 2003** :Antimicrobialactivityofessentialoils on the native microflora of organicSwisschard, Lebensm.-Wiss.u.-Technol.36, p.679-684.Journal of ClinicalMicrobiology 36 : p2093-95.
- POTTIERG., 1981** : *Artemisiaherba-alba* .Flore dela Tunisie : Angiospermes dicotylédonesgamopétales, p 1012.
- PRADEAU D.et DAUPHINC., 2007** : Chromatographie planaire : applications. Dossier p1476, Base documentaire : Techniques d'analyse, vol. Papier n° TA2.

Références bibliographiques

- PROKSCHP., HANSELR., KELLERK., RIMPLERH., SCHNEIDER G. and ANDHRSG., 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 OPREAE., 2004** : Capillary gas chromatography-mass spectrometry of volatile and semi-volatile compound of *Salvia officinalis*. Journal of Chromatography A 2004 ; 1027 :p121 - 126.
- RAHALS., 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 KJ. and RAY C.G., 2004** : Sherris Medical Microbiology (4th ed). McGRAW Hill. ISBN 083858299.
- REGNAULT J.P., 2000** : Microbiologie générale. Microorganismes commensaux. Dcariempritréal. 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 toxic activity and reproductive inhibition induced by monoterpenes on *Acanthoscelides obtectus* (Say) (coleoptera), a bruchid of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Storodres* 31, p291-299.
- REMIC., 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 wastbankregion, *Journal of Ethnopharmacological*, p 83 : 251-263.
- SALEH N. A. M., EL-NEGOUMY S. I., ABD-ALLA M. F., ABOU-ZAID M. M., DELLAMONICA G. and CHOPINJ., 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 eucalyptus oil and eucalyptus oil against herpes simplex virus in cell culture. *Pharmazie*, 56, p 343-347.
- SCHWEDT G., 1993** : Méthodes d'analyse. Ed. Flammarion.

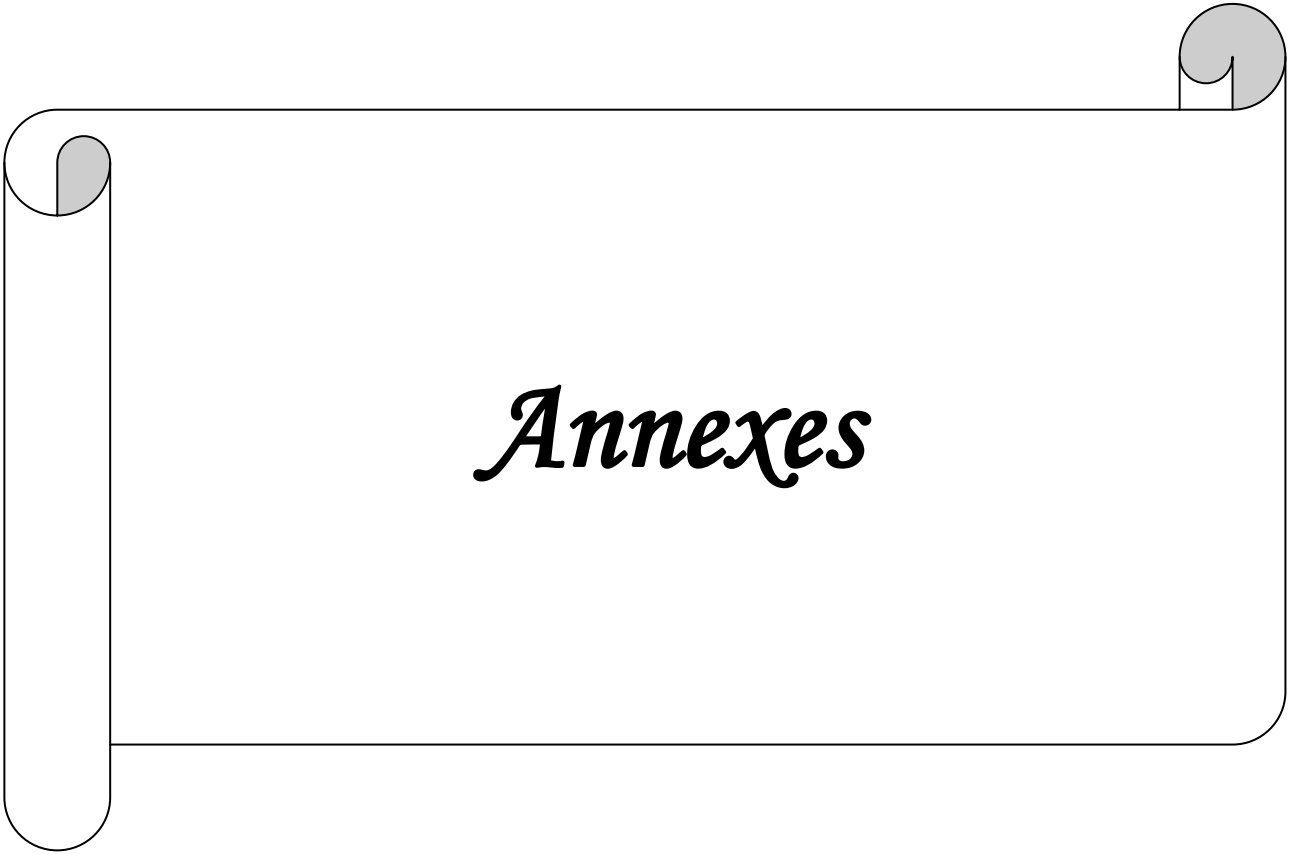
Références bibliographiques

- 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 cinnamaldehyde and cinnamyl alcohol. *Toxicol. App. Pharmacol* p 168, 189-99.
- SUDANO., 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 ROWLEY A.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>.
- SVOLBODA. and GREENAWAY R.I., 2003** : Investigation of volatile oil glands of *Satureja hortensis* L. (Summersavory) and phytochemical comparison of different varieties. *International Journal of Aromatherapy* 13 : p 195-202.
- 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.
- TEUSCHERE., ANTON R. et LOBSTEINA., 2005** : Plante aromatiques. Epices, Aromates, condiment et huiles essentielles. Ed. TED & DOC. Lavoisier. p 444.
- TIM CUSHNET. 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 pädagogique. Canada, p 945.
- 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 Santé bien-être, p 95
- WHITENAY M. and BACHEWICH C., 2007** : Morphogenesis in *Candida albicans*. *Annual Review of Microbiology* 61: p 529-553.
- YILDIZ K., BASALAN M., DURUO. and GOKPINARS., 2011** : Antiparasitic Efficiency of *Artemisia absinthium* on *Toxocara cati* in Naturally Infected Cats. *Turkiye Parazitoloj 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.* p 16, 69-64.
- ZERROUKIK., 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.

Références bibliographiques

Les sites internet

Anonyme 3 (en ligne) : http://fr.wikipedia.org/wiki/Salvia_officinalis1



Annexes

Annexe

La composition des milieux de culture

➤ Bouillon nutritif

Composition en g/l

Peptone	10 g
Extrait de viande	5 g
Chlorure de Sodium.....	5 g
pH.....	7,2

Répartir en tube à essais (7 à 10ml)

Autoclave 20 minutes à 120 °C.

➤ Chapman

Peptone :.....	10, g
Extrait de viande de bœuf :.....	1 g
Chlorure de sodium :.....	75 g
Mannitol :.....	10 g
Rouge de phénol	0,025 g
Agar.....	15 g
pH.....	7,4

Autoclave 20 minutes à 120 C°.

Utiliser le milieu coulé en boîte de pétri

➤ **Eau physiologique stérile**

Chlorure de sodium (NaCL)	9 g
Eau distillée	1L
PH.....	7

Stérilisation à 120° C/ 15 min.

➤ **Gélose Nutritive**

Ingrédients en grammes par litre d'eau distillée ou déminéralisée

Peptone	5 g
Extrait de viande	1,0g
Extrait de levure.....	2,5 g
Chlorure de sodium	5 g
Agar.....	15 g
pH.....	7

Autoclave 20 minutes à 121 C°.

➤ **Gélose Nutritive Ordinaire**

Ingrédients en grammes par litre d'eau distillée ou déminéralisée

Peptone	5 g
Extrait de viande	1 g
Extrait de levure.....	2,5 g
Chlorure de sodium	5 g
Agar.....	15, g
pH.....	7

Répartir en tubes à essais (6à7ml) ;

Autoclave 20 minutes à 120° C ;

Solidifier les tubes en position inclinée.

➤ **Mueller-Hinton**

Ingédients en grammes par litre d'eau distillée ou déminéralisée

Infusion de viande bovine Déshydraté	2 g
Hydrolysate acide de caséine	17,5g
Amidon soluble	1,5g
Agar	15 g
Eau distillée.....	15 g
pH.....	7,4

Autoclave 15 minutes a 115 °C

Répartir en boites pétri

➤ **King A**

Ingédients en grammes par litre d'eau distillée ou déminéralisée.

Peptone dite "A"	20 g
Sulfate de potassium	10 g
Glycérol	10 ml
Chlorure de magnésium	1,4 g
Agar	12 g
PH	7,2

Autoclave 20 minutes a 120 C°

➤ **King B**

Ingrédients en grammes par litre d'eau distillée ou déminéralisée

Peptone dite "B"	20 g
Glycérol.....	10 g
Phosphate dipotassium	1,5 g
Sulfate de magnésium	1,5 g
Glycérol	10 ml
Agar	12 g
PH	7,2

Autoclave 20 minutes a 120 °C.

➤ **Sabouraud + Chloramphénicol**

Gélose de Sabouraud.....	1000 ml
Chloramphénicol.....	0.5 g

➤ **Sabouraud**

Peptone.....	10 g
Glucose massé.....	20 g
Agar	15 g
pH	6

➤ **Composition de milieu minérale de test candida**

Glucose	0.5g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0.5g
KH ₂ PO ₄	1g
Agar.....	15g
PH.....	7

Les colorants

Il est conseiller de la préparé au moment de l'emploi

➤ **Le violet de gentiane**

Violet de gentiane.....	10g
Phénol.....	20g
Ethanol.....	100ml
Eau distillée.....	1L

➤ **Le fuchsine**

Fuchsine basique	10g
Phénol.....	50g
Ethanol.....	100ml
Eau distillée.....	1L

➤ **Le lugol**

Iode	0.5g
Iodure de potassium.....	1.5g
Eau bi-distillée.....	100ml