

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE  
جامعة عمار ثليج  
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT

كلية العلوم  
FACULTE DES SCIENCES  
قسم البيولوجيا  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



## Mémoire

*En vue de l'obtention du diplôme de Master*

*Filière : Sciences Biologiques*

*Option : Microbiologie appliquée*

### THEME

---

**L'étude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Alpinia officinarum* sur la souche *staphylococcus aureus* résistante à la méticilline (MRSA).**

---

**Devant le jury :**

**Président(e) :** Chaibi rachid

**Rapporteur :** Benaceur farouk

**Examineur(ric)e(s) :** Gouzi hicham

**Présenté par :**

Boukhalkhal Nour El Houda

Bennakhala Soumia

**Soutenu publiquement le :14/05/ 2018.**

## *Remerciements*

*Nous tenons tout d'abord à remercier monsieur Benaceur Farouk, notre encadreur de mémoire, pour tout le soutien, l'aide, l'orientation, la guidance qu'elle nous'a apportés ainsi que pour ses précieux conseils et ses encouragements lors de la réalisation de notre mémoire.*

*Nous tenons ensuite à remercier Mr : Gouzi Hcham notre co-encadreur pour le soutien inconditionnel dans le laboratoire ils ont fait confiance à nous depuis le premier jusque au dernier moment au laboratoire.*

*Nous souhaitons aussi à remercier, Melle Fatima Aouissi ingénieur de laboratoire et son dévouement à son travail et de surmonter toutes les difficultés que nous avons affrontées grâce à elle et leur soutien sans faille*

*Nous remercions également toutes les personnes qui, de près ou de loin, de moi.*



## *Dédicace*

*Je dédie ce travail :*

*A mon Cher Père Tayeb*

*Pour ses sacrifices et ses qualités humaines  
qui m'ont permis de vivre ce jour.*

*Si je suis ici aujourd'hui, c'est grâce à vous pa*

*A ma Chère Mère wahiba*

*Qu'elle trouve en moi la source de leur fierté  
et qui m'a toujours apporté soutien et amour.*

*A mes frères et sœurs*

*Amel, Fatima, Abir ,Afrah ,Salsabil ,Bouchra Rym ,fatiha  
wissam,tasnim, et Omar El Farouk,*

*A ma chère famille professionnelle*

*A tous mes professeurs qui m'ont accompagné tout au long de mes études*

*A mes chères Amies*

*mes chères sœurs soumia ,meriem kenza sara, faiza ,  
sarah,khaoula,kaouter,yasmine belkasem*

*Et*

*Toute ma 2<sup>ème</sup> famille de master 2 microbiologie. Pour notre amitié et tous  
les bons moments qu'on a passés ensemble.*

*Pour votre présence, vos bons conseils et nos fous rires partagés*

*Un très grand merci à tous et à toutes.*

*Nour el houða*

## *Dédicaces*

*À mon très cher père*

*Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis, jour et nuit pour mon éducation et mon bien être*

*À ma très chère mère*

*Affable, honorable, aimable : Vous représentez pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple de dévouement. Vous n'avez pas cessé de m'encourager et de prier pour moi*

*À mes très chers frères :*

*Les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous . Mes anges gardiens et mes fidèles compagnons dans les moments les plus difficiles. Je vous souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité*

*A mon cher binôme Houda qui m'a partagé la difficulté de ce travail*

*A tous mes collègues de la 2eme année master microbiologie*

*A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce travail soit possible, je vous dis merci*

*Soumia*

### **Résumé:**

Une étude de l'activité anti MRSA d'huile essentielle d'*Alpinia officinarum* de la famille des Zingibéracées a été réalisée ainsi pour la première fois. L'extraction des huiles essentielles de *Alpinia officinarum*, accomplie par hydrodistillation a donné un rendement de 0,51 % moyenne de trois extraction.

L'activité antibactérienne par la méthode de (puits et de disques) montre une efficacité modérée vis-à-vis de la souche SARM testé (de très grande taux de sensibilité) vis à vis de l'huile essentielle.

Le teste d'antibiogramme montre que le Nitrofurantoin (F) et L'antibiotique le plus sensible par une zone d'inhibition de 35,92.

La concentration minimale inhibitrice est de **5 mg /ml**, notée pour la souche résistant à la méticilline MRSA. Cette inhibition est considérée comme modérée.

**Mots-clés:** *Alpinia officinarum*, Huile essentielle, L'activité antibactérienne, MRSA.

### Liste des tableaux

Tableau 01	Principaux antioxydants non enzymatiques et sources alimentaires associées.	<b>11</b>
Tableau 02	Les résultats de diamètres de la zone d'inhibition obtenu méthode disque et puits	<b>30</b>
Tableau 03	Liste de quelque ATB testé pour la souche de MRSA+	<b>34</b>
Tableau 04	Rendements en huiles essentielles de <i>Alpinia officinarum</i>	<b>40</b>
Tableau 05	Diamètre d'inhibition de la souche de MRSA+ vis à vis 15 antibiotique.	<b>41</b>
Tableau 06	L'effet de l'extrait sur MRSA+ (méthode des disques).	<b>43</b>
Tableau 07	Concentration minimale inhibitrice (CMI) de quatre extraits végétaux contre <i>Staphylococcus aureus</i> et résistant à la méthicilline. <i>S. aureus</i> (SARM).	<b>47</b>

## Liste des figures

Figure 01	présente les composés les plus communs que l'on trouve dans les huiles essentielles et qui sont classés selon leurs poids moléculaires, leur température d'ébullition et leurs solubilités dans l'eau.	<b>6</b>
Figure 02	Structures de quelques composés aromatiques.	<b>7</b>
Figure 03	exemple d'une activité antimicrobienne (antifongique et antibactérienne) d'huile essentielle d' <i>Alpinia officinarum</i> .	<b>12</b>
Figure 04	les étapes de l'extraction des huiles essentielles.	<b>14</b>
Figure05	illustration de l'opération de hydrodistillation.	<b>16</b>
Figure 06	Planche de dessin d' <i>A. officinarum</i> .	<b>17</b>
Figure 07	Rhizome frais et rhizome séché d' <i>A. officinarum</i> .	<b>19</b>
Figure 08	exemple des disques d'antibiotiques leur familles et cibles.	<b>21</b>
Figure09	Coloration de Gram de <i>S. aureus</i> .	<b>22</b>
Figure 10	Culture de <i>S. aureus</i> sur gélose au sang.	<b>23</b>
Figure11	différent étapes de protocole expérimental.	<b>28</b>
Figure 12	Rhizome sèche d' <i>A. officinarum</i> .	<b>29</b>
Figure13	souches microbiennes testées.	<b>30</b>
Figure14	image représentatif de la zone d'inhibition sur puits et disque.	<b>30</b>
Figure15	la souche bactérienne <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA+) ATCC 43300.	<b>31</b>
Figure16	Montage de l'hydrodistillateur ( <i>Clevenger</i> ).	<b>32</b>
Figure17	Dilution de l'HE dans le Diméthylsulfoxyde (DMSO).	<b>34</b>
Figure18	Illustration de la méthode d'aromatogramme.	<b>35</b>
Figure19	Méthode de puits.	<b>36</b>
Figure20	Méthode de la détermination de CMI en milieu liquide.	<b>37</b>
Figure21	Détermination de la CMI en milieu solide.	<b>38</b>
Figure22	Huile essentiel pure après extraction.	<b>39</b>
Figure23	Résultats obtenu des différent antibiotiques testée (d'antibiogramme)	<b>41</b>
Figure 24	Diagramme de l'effet de l'extrait sur MRSA+ (méthode des puits).	<b>43</b>
Figure 25	L'effet de l'extrait sur la souche de MRSA+ (méthode des puits).	<b>44</b>
Figure26	L'effet de l'extrait sur la souche de MRSA+ (méthode des disques).	<b>44</b>
Figure27	Résultat de CMI sur milieu liquide	<b>46</b>
Figure28	La CMI de la souche testée est de 50 µl (premier tube dans lequel aucune croissance n'est visible à l'œil nu).	<b>46</b>

Figure29	Résultat obtenue de CMI sur milieu solide MH.	<b>48</b>
Figure30	résultat finale de CMI corresponde à la concentration de 50 $\mu$ l.	<b>48</b>

## Liste d'abréviation

- FOX** : Céfoxitine .
- CIP** : Ciprofloxacine.
- CTX** : cefotaxime .
- TIM** : Ticarcillin-clavanic acid .
- SXT** : sulfaméthoxazole.
- NA** : Nalidixic acid .
- AMP** : Ampicillin .
- IMI** : Imipenem .
- CT** : Colistin .
- KZ** : Cefazolin .
- AML** : Amoxicillin-clavulanic acid.
- F** : Nitrofurantoïne.
- AK** : Amikacine .
- CN** : gentamycine .
- ATCC**: American type culture collection.
- AMP** : Ampicilline.
- BN** : Bouillon nutritive.
- °C**: Degrés Celsius.
- SM** : solution mère .
- CMI** : Concentration minimale inhibitrice.
- CMB** : Concentration minimale bactéricide.
- D.O**: Densitomètre.
- FOX** : cefoxitine.
- GN** : la gélose nutritive.
- g** : gramme.
- H** : heures.
- ml** : millilitre.
- µl** : microlitre.
- mm** : millimètres.
- MH** : Mueller –Hinton.
- MRSA** : *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline.
- P** : Pénicilline.
- S.aureus** : *Staphylococcus aureus*.
- VA** : Vancomycine.
- UFC**: Unité formant colon.

## Sommaire

Introduction général.....	1
<b>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
I- Les huiles essentielles.....	3
I.1. Définition.....	3
I.2. I-2-Origin des huiles essentielles.....	3
I-3-Propriété de l'huile essentielle.....	4
I-3-1-Propriétés chimiques.....	4
I-3-2-Propriétés physiques.....	4
I-4-Composition chimique des huiles essentielles.....	4
I-4-1-Les terpènes.....	5
I-4-2-Les monoterpènes.....	5
I-4-3-Les sesquiterpènes.....	5
I-5-Les composés phénoliques.....	6
I-6-Composés aromatiques.....	7
I-7-Composés d'origine diverses.....	7
I-8-Notion de chémotype.....	8
I-9-Propriétés pharmacologiques des huiles essentielles.....	8
I-10-Facteurs influençant la composition.....	8
I-11-Activités biologique des huiles essentielles.....	9
I-11-1-Propriétés antibactériennes.....	9
I-11-2-Propriétés antioxydantes.....	10
I-11-2-1-Mécanismes d'action des antioxydants.....	10
I-11-3-Propriétés antifongiques.....	11
I-12-Précautions d'emploi.....	12
I-13-Toxicité des huiles essentielles.....	12
I-14-Conservation des huiles essentielles.....	13
I-15-Extraction des huiles essentielles.....	13
I-15-1-Les étapes de l'obtention d'une huile essentielle.....	13
I-15-2-Méthodes d'Extractions des huiles essentielles.....	14
I-15-2-1-L'hydrodistillation.....	15
II- <i>Alpinia officinarum</i> Hance 1873.....	17

II-1-Description de la plante.....	17
II-2-Confusion entre le <i>A.officinarum</i> et <i>A. galanga</i> .....	18
II-3-Description macroscopique du rhizome.....	18
II-4-Classification botanique.....	19
II-5-Etymologie des mots galanga et Alpinia.....	19
III-Les antibiotiques.....	20
III-1-Les cibles bactériennes des antibiotiques.....	20
III-2-L'antibiogramme.....	20
III-2-1-Notion du bactériostatique et du bactéricide.....	20
IV-Description de la souche.....	21
IV-1-Place du <i>S. aureus</i> dans le genre <i>Staphylococcus</i> .....	21
IV-2-Caractères bactériologiques.....	22
IV-2-1- Morphologie.....	22
IV-2-1-1-Morphologie des colonies de <i>S. aureus</i> .....	22
IV-2-2-Habitat.....	23
IV-2-2-1-Dans l'environnement.....	23
IV-2-2-2-Chez l'homme.....	24
IV-3-Pouvoir pathogène de <i>S. aureus</i> .....	24
IV-4- <i>S. aureus</i> résistant à la meticilline SARM ou MRSA.....	25
IV-4-1-Facteurs de risque d'infection à <i>S. aureus</i> résistant à la méticilline (SARM)...	26
IV-4-2-Prévention des infections à SARM au laboratoire.....	26
<b>MATERIEL ET METHODE</b>	
II-1-Matériel végétal .....	28
II-2-Le pré-test des souches bactériennes par méthode de puits et de disque.....	29
II-3-Origine de la souche bactérienne.....	31
II-4-Extraction des huiles essentielles.....	31
II-5-Description du dispositif d'extraction.....	31
II-6-Méthode d'extraction de (HE) par hydrodistillation .....	31
II-7-Rendement en huile essentielle (RHE).....	32
II-8-Détermination de la sensibilité aux antibiotiques.....	33
II-8-1-Technique d'Antibiogramme .....	33
II-8-2-Lecture.....	33
II-9-Evaluation de l'activité antibactérienne.....	34

II-9-1-Préparation des dilutions d'huile essentielle.....	34
II-9-2-Méthode des disques.....	35
II-9-3-Méthode de puits.....	35
II-9-4-Conservation des souches .....	36
II-10-Méthode de détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) sur milieu liquide .....	36
<b>EXPRESSION DES RESULTATS</b>	
III-1-Propriétés organoleptiques de l'extrait .....	39
III-2-Rendement.....	39
III-3-Antibiogramme.....	40
III-4-Aromatogramme.....	42
III-5-Concentration minimale inhibitrice CMI .....	45
III-6-Résultats de CMI sur milieu solide.....	48
Conclusion .....	49
Références bibliographique .....	

**Abstract:**

A study of the anti-MRSA activity against the essential oil of *Alpinia officinarum* which is a part of the zingiberaceae family it was realized for the first time .the extraction of essential oil of *Alpinia officinarum* , accomplished by hydrodistillation it give a yield of 0.51% average of three extractions.

The antibacterial activity by (wells and disks) process shows a moderate efficacy against the strain MRSA tested (very high sensitivity) against the essential oil.

The susceptibility test shows that Nitrofurantoin (F) is the most antibiotic sensitive by an inhibition zone of 35.92.

The minimum inhibitory concentration is **5 mg/ ml**, noted for the methicillin resistant strain MRSA, this inhibition is considered moderate.

**Keywords:** *Alpinia officinarum*, Essential oil, the antibacterial activity, MRSA.

:

اجرينا لأول مرة دراسة عن نشاط مضاد للبكتيريا العنقودية المقاومة للميثيسيلين ضد الزيت العطري لعشبة الخنجان من عائلة الزنجبيلات حيث اعطى استخلاص زيت هذا الاخير ثلاثة مرات مردودية تقدر بـ 0.51 , التي أنجزت بطريقة التقطير المائي .  
يظهر ا النشاط المضاد للبكتيريا بواسطة طريقة (الابار والاقراص) فعالية معتدلة ضد البكتيريا العنقودية للميثيسيلين (حساسية عالية) مقابل الزيت العطري لعشبة الخنجان.  
يظهر اختبار الحساسية للمضادات الحيوية أن النيتروفيرونتوان هو المضاد الحيوي الأكثر حساسية حيث ان منطقة تثبيط تبلغ 35.92.

يقدّر الحد الأدنى للتركيز التثبيطي الملاحظ بالنسبة العنقودية للميثيسيلين بـ: 5 / وهذا  
الاخير يعتبر معتدل.  
الكلمات المفتاحية: , الزيت , النشاط البكتيري , للبكتيريا العنقودية المقاومة للميثيسيلين.



### I- Les huiles essentielles

#### I-1-Définition

Le terme « Huiles essentielles » est un terme générique qui désigne les composants liquides et hautement volatiles des plantes, marqués par une forte et caractéristique odeur. En effet, les huiles essentielles sont des complexes naturels de molécules volatiles et odorantes, synthétisées par les cellules sécrétrices des plantes aromatiques (**Duquénois and Anton, 1968**).

Ce sont des liquides huileux aromatiques, volatils, caractérisés par une forte odeur, souvent colorés, et généralement avec une densité inférieure à celle de l'eau. Ils peuvent être synthétisés par tout organe végétal (fleurs, bourgeons, graines, feuilles, brindilles, écorces, herbes, bois, fruits et racines) et stockés dans des cellules sécrétoires, des cavités, des canaux, des cellules épidermiques ou des trichomes glandulaires (**Burt, 2004 ; Bakkali et al. 2008**).

Les huiles essentielles ne représentent qu'une petite fraction de la composition de la plante néanmoins, elles confèrent les caractéristiques par lequel les plantes aromatiques sont utilisées dans l'alimentation, le domaine de la cosmétologie et les industries pharmaceutiques (**Pourmortazavi et Hajimirsadeghi, 2007**).

#### I-2-Origine des huiles essentielles

Toutes les parties des plantes aromatiques, tous leurs organes végétaux, peuvent contenir de l'huile essentielle.

- Les fleurs: oranger, rose, lavande ; le bouton floral (girofle) ou les bractées.
- Les feuilles: eucalyptus, menthe, thym, laurier, sarriette, sauge, aiguilles de pin et sapin.
- Les organes souterrains: racines (vétiver, angélique), rhizomes (gingembre, acore, petit galanga)
- les fruits: fenouil, anis, épicarpes des Citrus.
- Les graines : noix de muscade.
- Le bois et les écorces: cannelle, santal, bois de rose.

Les huiles essentielles sont stockées dans des structures cellulaires spécialisées (cellules à huile essentielle, cellules à poils sécréteurs (comme dans la menthe), canaux sécréteurs) et ont vraisemblablement un rôle défensif : protection du bois contre les insectes et les champignons, action répulsive contre les animaux herbivores.

La concentration dans les plantes est en général faible, aux alentours de 1 à 2% voire moins, mais il y a des exceptions comme le clou de girofle avec 15% d'huile essentielle ou la noix de muscade, 5-15%.

Parmi les familles végétales les plus productrices d'huiles essentielles, on distingue les labiateae (famille du thym, de la lavande, de la menthe, du basilic), les asteraceae (camomille, absinthe), les myrtaceae (eucalyptus, melaleuca, myrte, girofle), les lauraceae (cannelle, laurier).

Beaucoup de végétaux contiennent des huiles essentielles ou des substances voisines mais en pratique peu d'espèces sont utilisées (**Hurtel, 2006**).

### **I-3-Propriété de l'huile essentielle**

#### **I-3-1-Propriétés chimiques**

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes et éminemment variables de constituants qui appartiennent à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes: le groupe des terpénoïdes d'une part et le groupe des composés aromatiques dérivés de phénylpropane, beaucoup moins fréquents d'autre part (**Bruneton, 1993**).

#### **I-3-2-Propriétés physiques**

Liquides à température ambiante, les huiles essentielles sont volatiles, ce qui les différencie des huiles fixes. Elles ne sont que très rarement colorées. Leur densité est en général inférieure à celle de l'eau.

Elles ont un indice de réfraction élevé et la plupart dévient la lumière polarisée. Solubles dans les solvants organiques usuels, elles sont liposolubles. Entraînables à la vapeur d'eau, elles sont très peu solubles dans l'eau; elles le sont toutefois suffisamment pour communiquer à celle-ci une odeur nette (on parle d'eau aromatique) (**Bruneton, 2008 ; Baser et Buchbauer, 2010**).

### **I-4-Composition chimique des huiles essentielles**

Plus de 300 composés différents peuvent être identifiés dans les huiles essentielles. Trois groupes de composés ont été décrits (**Pichersky et al., 2006**). Le principal groupe est composé de terpènes et les terpénoïdes, majoritairement des monoterpènes et des sesquiterpènes (**Ruberto and Baratta, 2000**), les autres groupes comprennent les composés aromatiques (phénoliques) et dans une moindre mesure

des composés aliphatiques (alcane et alcène) qui sont généralement en trace. Tous les composés sont caractérisés par un faible poids moléculaire (**Bakkali et al., 2008**).

### **I-4-1-Les terpènes**

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structure cyclique ou de chaîne ouverte. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'unités **isoprénique** à 5 atomes de carbone (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>). Ils sont subdivisés selon le nombre d'entités isoprènes en **monoterpènes** formés de deux isoprènes (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>), **les sesquiterpènes**, formés de trois isoprènes (C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>), **les diterpènes**, formés de quatre isoprènes (C<sub>20</sub>H<sub>32</sub>). **Les tetraterpènes** sont constitués de huit isoprènes qui conduisent aux caroténoïdes. **Les polyterpènes** ont pour formule générale : (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>)<sub>n</sub> ou n peut être de 9 à 30 **Les terpénoïdes** sont des terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhydes, cétone, acide) (**Bakkali et al., 2008**).

### **I-4-2-Les monoterpènes**

Sont volatils, entraînés à la vapeur d'eau, d'odeur souvent agréable et représentent la majorité des constituants des H.E, parfois plus de 90%. Ils peuvent être acyclique (myrcène, o-cymène), monocyclique (terpinène, p-cimène) ou bicyclique (pinène, sabinène). A ces terpènes se rattachent un certain nombre de substances à fonction chimique :

- Alcools : géraniol, menthol.
- Aldéhydes : géraniol, citronellal, sinesol.
- Cétones : carvone, menthone, -vétinone.
- Esters : acétate de géranyl, acétate de linalyl, acétate de cédryle, acétate -terpinyle
- Peroxydes : ascaridol, allicine (**Bruneton, 2008**).

### **I-4-3-Les sesquiterpènes**

il s'agit de la classe la plus diversifiée des terpènes. Elle contient plus de 3000 molécules comme par exemple : -caryophyllène, -bisabolène, -humulène, -bisabolol, farnesol (**Bruneton, 1999**).

	Formule moléculaire	Température d'ébullition	Solubilité dans l'eau (g/L)
<b>Monoterpènes</b>	Limonène C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	175.4	< 10-3
	Pinène C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	157.9	< 10-3
	Sabinene C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	164	< 10-3
	Myrcène C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	167	< 10-3
	Terpinène C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	183	< 10-3
	para-Cymène C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	173.9	< 10-3
<b>Sesquiterpènes</b>	B-Caryophyllene C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	268.4	< 10-3
	α-Santalene C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	247.46	< 10-3
	α-Zingiberene C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	270.7	< 10-3
	B-Curcumene C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	266	< 10-3
<b>Diterpène</b>	Phytol C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O	335.5	< 10-3
<b>Alcools</b>	Géranol C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> OH	229.5	0.67
	Linalool C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> OH	198.5	0.67
<b>Aldéhydes</b>	Citral C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	210.9	2.61
	Cuminicaldéhyd C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O	254.6	0.26
<b>Ketones</b>	Camphor C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	207.4	0.92
	Carvone C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	230.5	1.60
<b>Phénols</b>	Thymol C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	233	0.85
	Eugénol C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	255	2.52
<b>Acétates</b>	Nerylacétate C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	274.5	0.71
	Linalylacétate C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	220	0.57
<b>Oxydes</b>	1,8-Cineol C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	174.8	5.8 x 10-3
	Linalool C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	198.5	0.67

Figure 01: présente les composés les plus communs que l'on trouve dans les huiles essentielles et qui sont classés selon leurs poids moléculaires, leur température d'ébullition et leurs solubilités dans l'eau. (B.AYADIA. ;2011).

### I-5-Les composés phénoliques

Les composés phénoliques dérivés du phénylpropane (C6-C3) sont beaucoup moins fréquents que les terpènes. Souvent, ils sont des allyl, des propénylphénols et parfois des aldéhydes. Selon le mode d'extraction, les huiles essentielles peuvent renfermer d'autres composés chimiques, le plus souvent de faible masse moléculaire tel que : les hydrocarbures (linières et ramifiés, saturés ou non saturés), les acides (de C3 à C6), les alcools, les aldéhydes, les cétones, les esters acycliques, les lactones et les coumarines (Asma ; 2010).

### I-6-Composés aromatiques

Les dérivés du phénylpropane (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>) ou composés phénoliques s'agissant le plus fréquemment des allyl- et propénylphénols, parfois des aldéhydes. La biosynthèse par voie phenylpropanoïdes débute par des aromatiques que sont la phénylalanine et la tyrosine, Ils sont généralement caractérisés par la présence d'un groupement hydroxyle fixé à un cycle phényle.

Egalement, la synthèse de ces constituants nécessite une série d'acides dont l'acide shikimique et l'acide cinnamique. Les phénylpropanoïdes sont moins répondeu dans l'HE que les terpènes, néanmoins elles sont caractéristiques dans certaines huiles essentielles d'Apiaceae : (anis, fenouil, persil, cannelles (eugénole, myristicine, asarones, cinnamaldéhyde) (**Bruneton, 1999**).

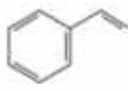
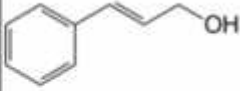
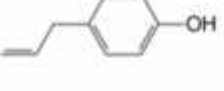
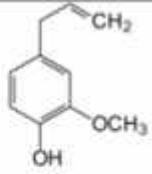
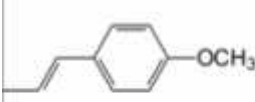
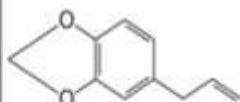
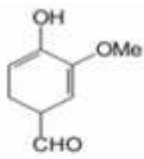
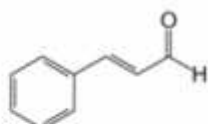
			
<b>Styrene</b> benzene	<b>Cinnamyl alcohol</b> alcohol	<b>Charvicol</b> phenol	<b>Eugenol</b> phenol
			
<b>Anethol</b> Methoxy derivative	<b>Safrol</b> Methylene dioxy compound	<b>Vaniline</b> Phenol	<b>Cinnamaldehyde</b> phenol

Figure 02: Structures de quelques composés aromatiques.(**B.BAYALA. ;2014**).

### I-7-Composés d'origine diverses

Il s'agit de produits résultant de la transformation de molécules non volatiles (composés issus de la dégradation d'acides gras ou d'autres composés). Ces composés contribuent souvent aux arômes de fruits. Compte tenu de leur mode de préparation, les concrètes et les absolues peuvent en renfermer ces types de composés. Il en est de même pour les huiles essentielles lorsqu'elles sont entraînaables par la vapeur d'eau (**Bruneton, 1999**).

### **I-8-Notion de chémotype**

Le chémotype d'une HE est une forme de classification chimique, biologique et botanique désignant la molécule majoritairement présente dans une huile essentielle. Cette classification dépend des facteurs liés directement aux conditions de vie spécifiques de la plante à savoir le pays, le climat, le sol, l'exposition des végétaux, les facteurs phytosociologiques et la période de récolte qui peuvent influencer la composition de l'huile essentielle (**Zhiri et baudoux, 2005**).

### **I-9-Propriétés pharmacologiques des huiles essentielles**

Les huiles essentielles sont employées pour :

- Leur saveur et odeur en industrie des produits naturels et en industrie des parfums.
- Des propriétés antiseptiques pour les poumons et les reins ou comme bain de bouche.
- Dépuratives, cicatrisantes, analgésiques et anti-inflammatoires.
- Des activités antimicrobiennes, antifongiques, antiparasitaires et antihelminthiques et aussi des propriétés antioxydants .
- Un effet anesthésiant pour soigner les douleurs rhumatismales.
- Action stimulante sur l'utérus, effet abortif en cas d'intoxication.
- Action sur le système nerveux central, en exerçant des effets sédatif, relaxant et déstressant.
- Effet anticancéreux, en stimulant l'apoptose des cellules tumorales (**Daniel, 2006; Hüsnü et Buchbauer, 2010**).

Plusieurs études ont montrés que l'utilisation des huiles essentielles peut diminuer lestroubles menstruels, le stress post-partum ainsi que les troubles ménopausiques (**Lardry, 2007**).

### **I-10-Facteurs influençant la composition**

La composition chimique et le rendement en huiles essentielles varient suivant diverses conditions : l'environnement, le génotype, l'origine géographique, la période de récolte, la méthode de séchage, le lieu de séchage, la température et la durée de séchage, les parasites, les virus et les mauvaises herbes.

C'est ainsi que l'action des huiles est le résultat de l'effet combiné de leurs composés actifs et inactifs, ces composés inactifs pourraient influencer la disponibilité

biologique des composés actifs et plusieurs composants actifs pourraient avoir un effet synergique (**Svobda et Hampson, 1999 ; Smallfield, 2003**).

La qualité et la quantité extraite d'une huile essentielle dépendent de plusieurs facteurs à savoir :

Intrinsèques: les facteurs génétiques, la localisation, le degré de maturité.

Extrinsèques : le sol, le climat, l'environnement.

Technologiques : type de culture, mode de récolte, mode d'extraction (**Asma ;2010**).

### **I-11-Activités biologique des huiles essentielles**

#### **I-11-1-Propriétés antibactériennes**

L'huile essentielle possède des propriétés antibactériennes très importantes : elle est utile pour lutter contre les infections respiratoires et urinaires. En gargarismes, elle prévient et soigne les infections de la gorge.

Elle favorise la digestion, stimule la production de bile, évite les fermentations intestinales, calme les douleurs gastriques d'origine nerveuse, les diarrhées et les crampes abdominales. Elle agit aussi contre les parasites intestinaux.

Avec son parfum frais, piquant et herbacé, elle stimule les glandes surrénales.

Elle agit comme un tonique et stimulant sexuel (en particulier pour les hommes).

Diluée et utilisée en massages ou en frictions, elle tonifie en cas de fatigue physique et intellectuelle, permet de lutter contre le stress et renforce le système immunitaire. En diffusion dans l'air ambiant, elle stimule les capacités intellectuelles (**Buronzo, 2008**). L'huile essentielle est aussi connue pour son effet carminatif, expectorant, et astringent. Elle a été utilisée en traitement contre les troubles d'estomac, et en traitement de l'anorexie (**Vârban et al., 2009**)

Les H.E les plus étudiées pour leurs propriétés antibactériennes appartiennent de plantes aromatiques à HE riches en composés phénoliques comme l'eugénol, le thymol et le carvacrol. Ces composés possèdent une forte activité antibactérienne.

Le carvacrol est le plus actif de tous, reconnu pour être non toxique, il est utilisé comme agent de conservation et arôme alimentaire dans les boissons, friandises et autre préparations sont utilisés dans les produits cosmétiques et, alimentaires.

Ces composés ont un effet antimicrobien contre un large spectre de bactéries : *E-coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium spp*, *Helicobacter pylori* (**Pauli, 2001**).

### **I-11-2-Propriétés antioxydantes**

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

Lorsque l'on parle d'activité antioxydante, on distingue deux sortes de propriétés 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 auto-catalytique 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 réduction d'oxygène (**Madhavi et al., 1996**).

Des études de l'équipe constituant le Laboratoire de Recherche en Sciences Appliquées à l'Alimentation (RESALA) de l'INRS-IAF, ont montré que l'incorporation des huiles essentielles directement dans les aliments (viandes hachées, légumes hachés, purées de fruit, yaourts...) où l'application par vaporisation en surface de l'aliment (pièce de viande, charcuterie, poulet, fruits et légumes entiers...) contribuent à préserver l'aliment des phénomènes d'oxydation (**Caillet et Lacroix, 2007**).

#### **I-11-2-1-Mécanismes d'action des antioxydants**

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulier, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la chélation des métaux de transition (**Favier, 2006**).

Selon leur mode d'action, les antioxydants sont classés en deux catégories :

- Système de défense primaire : comme la catalase, le glutathion (GSH). Ces antioxydants préviennent la production de ROS en limitant la phase d'initiation des réactions d'oxydation. Ils agissent donc en prévention.
- Système de défense secondaire : à titre exemple les tocophérols, sont capables de piéger directement les radicaux oxydants et sont ainsi des antioxydants «briseurs» de la chaîne radicalaire bloquant ainsi les réactions de propagation (**Buettner, 1993**).

Tableau 1 : Principaux antioxydants non enzymatiques et sources alimentaires associées (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

Principaux nutriments	Sources alimentaires
<b>Antioxydants</b>	
<b>Vitamine C</b>	Agrumes, melon, brocoli, fraise, kiwi, chou, poivron
<b>Vitamine E</b>	Huile : de tournesol, de soja, de maïs Beurre, œufs, noix.
<b>-carotène</b>	Légumes et fruits orangés, et vert foncés
<b>Sélénium</b>	Poissons, œufs, viande, céréales, volaille
<b>Zinc</b>	Viande, pain complet, légumes verts, huîtres, produits laitiers
<b>Flavonoïdes</b>	Fruits, légumes, thé vert
<b>Acides phénoliques</b>	Céréales complètes, baies, cerises
<b>Tanins</b>	Lentilles, thé, raisins, vin
<b>Métabolisme de cystéine, glutathion kg</b>	Caséine, Lactalbumine (petit-lait), produits laitiers Brocoli, chou œufs, poissons, viande

### I-11-3-Propriétés antifongiques

Un grand nombre de composés volatils ont été testés contre une large gamme de champignons : *Candida* (*C. albicans*), *Aspergillus* (*A. niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*), *Penicillium chrysogenum* (Kalemba et Kunicka, 2003).

Les huiles essentielles les plus étudiées dans la littérature pour leurs propriétés antifongiques appartiennent à la famille des *Labiatae* : thym, origan, lavande, menthe, romarin, sauge.

Etant donnée la grande complexité de la composition chémotypique des huiles essentielles, malgré de possibles synergies certains auteurs préfèrent étudier l'effet d'un composé isolé pour pouvoir ensuite le comparer à l'activité globale de l'huile. Ainsi l'activité fongistatique des composés aromatiques semble être liée à la présence de certaines fonctions chimiques (Voukou *et al.*, 1988).

Il a été démontré que l'activité antifongique augmente selon le type de fonction chimique : Phénols Alcools Aldéhydes Cétones Ethers Hydrocarbures. Parmi les aldéhydes, le cinnamaldéhyde s'est révélé le plus actifs (Yen et Chang, 2008).



Figure 03: exemple d'une activité antimicrobienne (antifongique et antibactérienne) d'huile essentielle *d'Alpinia officinarum* (photo originale).

### **I-12-Précautions d'emploi**

Cette huile doit être utilisée sur une période courte, car elle peut irriter la peau, surtout si elle est utilisée pure. Elle est interdite aux enfants, et déconseillée aux femmes enceintes, à celles qui allaitent et aux personnes ayant la peau sensible. Il faut éviter de la mettre en contact avec les yeux et les muqueuses (**Buronzo, 2008**).

### **I-13-Toxicité des huiles essentielles**

L'utilisation des huiles essentielles n'est pas à prendre à la légère. Les effets toxiques sont très variables d'une huile essentielle à l'autre et dépendent beaucoup de la sensibilité des consommateurs.

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes de molécules, dont on peut distinguer deux groupes : les terpènes et les aromatiques.

Les terpènes et leurs dérivés sont formés d'unités isopréniques (unités Pentacarbonnées ramifiées). Pour cette gamme de composés, seules les molécules de poids faible, entre 10 et 20 atomes de carbones, sont présents dans les huiles essentielles. Par conséquent, elles peuvent plus facilement pénétrer notre peau et ainsi provoquer des allergies et des inflammations.

Cependant, ces effets sont provoqués majoritairement par d'autres composés comme les lactones sesquiterpéniques, l'aldéhyde cinnamique et les phénylpropanoïdes.

Les huiles essentielles contenant certains composés aromatiques, notamment les phénols et dérivés, comme l'eugénol, le thymol et le carvacrol, sont à utiliser avec précautions. Ces molécules peuvent provoquer de sévères irritations sur les peaux sensibles ou les muqueuses. De plus, les cellules du foie peuvent se trouver altérées, lorsque les doses prises sont élevées et que la durée de la cure est longue.

D'autres familles de composés s'avèrent être également toxiques. Ceux sont les cétones, les aldéhydes et quelques esters. Les conséquences sur notre santé vont de la photosensibilisation et aux risques d'avortement, dans les cas les plus graves (**Cazzola et Doublet, 2015**).

### **I-14-Conservation des huiles essentielles**

Les huiles essentielles se conservent plusieurs années. Elles ont même tendance à se bonifier avec le temps (à l'exception des huiles essentielles extraites des zestes d'agrumes qui ne se conservent pas plus de 2 ans).

-Il est recommandé de les stocker dans des flacons en verre ambre ou foncé, de manière à les protéger de la lumière, il faut éviter les forts écarts de température et le contact avec l'air, il faut bien refermer les flacons après usage car les arômes s'évaporent dans l'atmosphère. Tenir les flacons hors de portée des enfants.

-Les flacons doivent être stockés en position verticale, en position horizontale, il y a un risque que le bouchon soit attaqué par l'huile (les huiles ont une action corrosive sur le plastique). Dans ces conditions, les huiles essentielles se conservent plusieurs années (**Patricia Bechaalany ; 2005**).

### **I-15-Extraction des huiles essentielles**

Une huile essentielle est définie comme le produit obtenu d'une plante ou certaines parties de celui-ci par hydrodistillation, distillation à la vapeur, distillation sèche ou par un procédé mécanique approprié sans chauffage (par exemple pour les agrumes) (**Rubiolo et al., 2010**).

Les différentes techniques d'extraction des huiles essentielles ou extraits aromatiques doivent d'une part, tenir compte des caractéristiques et d'autre part, apporter des performances quantitatives satisfaisant une forte demande toujours plus exigeante. Basée sur différents phénomènes physiques : la distillation, l'extraction ou la séparation, ces techniques seront présentées selon le principe sur lequel elles sont basées. (**Marie Elisabeth Lucc ;2005**).

#### **I-15-1-Les étapes de l'obtention d'une huile essentielle**

Les étapes de l'extraction des huiles essentielles d'origines végétales restent identiques quel que soit le « type » d'extraction utilisé. Il est nécessaire dans un premier temps d'extraire de la matière végétale les molécules aromatiques constituant l'huile essentielle, puis dans un second temps de séparer ces molécules du milieu par distillation. ( **Marie Elisabeth Lucc :2005**)

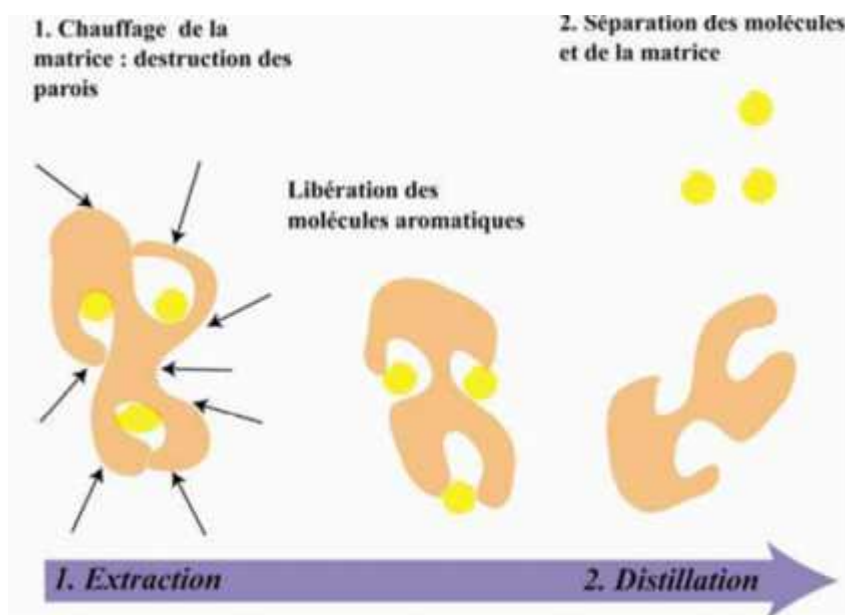


Figure 04: les étapes de l'extraction des huiles essentielles. ( Marie Elisabeth Lucc :2005).

### I-15-2-Méthodes d'Extractions des huiles essentielles

La quantité d'huile essentielle contenue dans les plantes est toujours faible, parfois très faible, voire infime. Il faut parfois plusieurs tonnes de plantes pour obtenir un litre d'huile essentielle.

L'extraction des huiles essentielles est certainement la phase la plus délicate. Elle a pour but de capter les produits les plus subtils et les plus fragiles élaborées par le végétal.

Il existe différents procédés d'extraction, mais le choix de la méthode utilisée définit obligatoirement la nature de l'essence ainsi que son éventuelle utilisation, en distingue les procédés suivant :

- Extraction par expression à froid
- Extraction par distillation et entraînement à la vapeur d'eau
- Hydrodistillation ou distillation à l'eau
- L'enfleurage
- Extraction par les solvants organiques
- Extraction par le CO<sub>2</sub>

\*l'hydrodistillation des rhizomes secs c'est la technique utilisée par nous dans notre travail et elle reste la technique la plus utilisée.

### **I-15-2-1-L'hydrodistillation**

L'hydrodistillation proprement dite, est la méthode normée pour l'extraction d'une huile essentielle, ainsi que pour le contrôle de qualité. Le principe de l'hydrodistillation correspond à une distillation hétérogène.

Le procédé consiste à Immerger la matière première végétale dans un bain d'eau. L'ensemble est ensuite porté à ébullition, généralement à pression atmosphérique (Figure 05).

La chaleur permet l'éclatement et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange azéotropique. Sachant que la température d'ébullition d'un mélange est atteinte lorsque la somme des tensions de vapeur de chacun des constituants est égale à la pression d'évaporation, elle est donc inférieure à chacun des points d'ébullition des substances pures. Ainsi le mélange azéotropique « eau + huile essentielle » distille à une température égale 100 °C.

À pression atmosphérique alors que les températures d'ébullition des composés aromatiques sont pour la plupart très élevées. Il est ensuite refroidi et condensé dans un essencier ou vase florentin. Une fois condensées, eau et molécules aromatiques du fait de leurs différences de densité, se séparent en une phase aqueuse et une phase organique : "l'huile essentielle".

La distillation peut s'effectuer avec ou sans recyclage de la phase aqueuse obtenue lors de la décantation. Le principe de recyclage est communément appelé cohobage. En laboratoire le système équipé d'une cohobe qui est généralement utilisé pour l'extraction des huiles essentielles en accord avec la Pharmacopée Européenne est le Clevenger.

La durée d'une hydrodistillation peut considérablement varier, pouvant atteindre plusieurs heures selon le matériel utilisé et la matière végétale à traiter. La durée de la distillation influe non seulement sur le rendement mais également sur la composition de l'extrait.

Afin de traiter des matières premières pour lesquelles il est difficile d'extraire l'huile essentielle ou pour les essences difficilement entraînaibles, l'hydrodistillation à pression élevée représente une bonne alternative. Cette technique est en outre utilisée pour le santal, le girofle ou les rhizomes de vétiver, de gingembre et d'iris.

Cependant, bien que le travail sous pression conduise à une amélioration du rapport d'entraînement donc à des économies d'énergie, une température élevée peut emmener une modification voire une altération de l'huile essentielle obtenue. D'autre part, le prix et les contraintes des équipements à mettre en oeuvre contribuent à freiner cette technique. (Marie Elisabeth Lucc,2005).

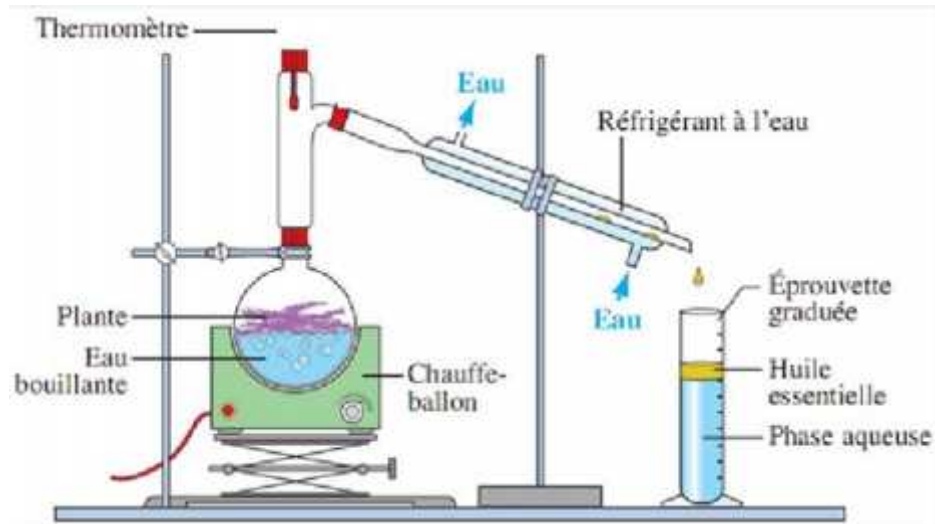


Figure05 : illustration de l'opération de hydrodistillation

### II-*Alpinia officinarum* Hance 1873

#### II-1-Description de la plante

Il est appelé en français petit galanga et en anglais '*fesser galanga*'. Le rhizome d'*Alpinia officinarum*, cultivé en Asie du Sud-Est a une utilisation très proche de celui d'*A. galanga* en tant qu'épice et dans la médecine populaire.

*A. officinarum* est une plante herbacée petite s'élevant à 1.5 mètres au maximum, possédant des feuilles sessiles et ligulées plus étroites (20-30 cm de long et 1.2-2.5 cm de large) (Figure06 ) (BOULLARD B ;2001).

Les fleurs constituent des grappes de 6-10 cm. Les bractéoles sont très petites, les bractées absentes ou minuscules. Le fruit, rouge, est une capsule globuleuse, de 1 cm de diamètre. (ZHENGI W ;1995).

Garcia D'Orta serait le premier médecin à distinguer deux sortes de galanga, en 1563 : selon lui, le petit galanga de plus petite taille acheté en Chine, le grand galanga, moins aromatique produit à Java (Hanbu ;1871). Plus tard, Rance a décrit *A.officinarum* (1873), comme le petit galanga appelé *Radix galangae minoris* ou parfois plus simplement *Radix galangae* ; *A. galanga* a été décrit par Willdenow (1797) sous le terme de *Radix galangae majoris*.



Figure 06: Planche de dessin d'*A. officinarum* . (BOULLARD B ;2001).

### II-2-Confusion entre le *A.officinarum* et *A. galanga*

Le rhizome séché disponible auprès des herboristes est celui d'*A. officinarum*. Il semblerait qu'en Europe, au niveau médicinal, seul *A. officinarum* soit décrit et utilisé. La distinction entre les deux espèces n'est néanmoins pas toujours bien faite et des confusions sont fréquemment observées, auprès des fournisseurs et dans certains ouvrages.

Elles sont parfois considérées comme formant une seule et même espèce alors qu'elles ont chacune une entité botanique bien spécifique. Souvent, le nom de galanga est mentionné, sans précision concernant l'espèce, ce qui est déjà une source de confusion. Dans ce cas, il est probable que l'espèce envisagée soit *A. officinarum*, plus utilisée qu'*A. galanga*. Au niveau culinaire, le grand galanga semble davantage utilisé.

Dans les supermarchés asiatiques, on trouve le rhizome frais sous le nom de galanga et 'khaa', de provenance thaïlandaise, suggérant l'utilisation d'*A. galanga*.

Cependant, dans ce cas, aucune identification de l'espèce n'est réellement faite et il est quasiment impossible de savoir lequel est utilisé, sans davantage d'éléments concernant la description macroscopique.

Les chinois font également la distinction entre les deux types de galanga 'liangjiang' 'Gao-liang-jiang' constitue le rhizome d'*A. officinarum* tandis que 'da-gaoliang-jiang' celui d'*A. galanga*. Ainsi, la plupart des drogues brutes vendues sous le nom de 'liang-jiang' sur les marchés japonais dans les années 1970 correspondaient au rhizome d'*A. galanga*, tandis que sur les marchés chinois et coréens on trouvait essentiellement du rhizome d'*A. officinarum*. On peut donc aussi penser que l'utilisation d'une espèce ou d'une autre dépende également des régions du monde. (Konoshima.m et all ;1976).

### II-3-Description macroscopique du rhizome

Le rhizome séché d'*A. officinarum*, quant à lui, est cylindrique, plus ou moins ramifié, de 1 à 2 cm d'épaisseur, de couleur brun rougeâtre, portant parfois des restes de tiges à leur extrémité (Figure7).

On observe des anneaux circulaires blanchâtres caractéristiques, inégalement espacés qui proviennent des bourgeons foliaires du rhizome, et des stries longitudinales fines. Sur la partie opposée, il reste quelques cicatrices racinaires et

racines. La cassure est difficile, très fibreuse et la consistance ligneuse (WICHTL.M ; 2003).



Figure 07: Rhizome frais et rhizome séché d'*A. officinarum* (Botanical.corn - mars 2005).

### II-4-Classification botanique

La famille des Zingibéracées est constituée de plantes herbacées, vivaces, terrestres, rhizomateuses, souvent à racines tubéreuses. Ce sont des plantes épicées aromatiques, à cellules sécrétrices dispersées contenant des huiles essentielles, divers terpènes et composés phénylpropanoïdes (JUDD et all ; 2002) ; certaines renferment aussi des matières colorantes (PELT J.M ;1999).

<b>Embranchement</b>	Spermaphytes
<b>Sous-embranchement</b>	Angiospermes
<b>Classe</b>	Monocotylédones
<b>Ordre</b>	Zingibérales
<b>Famille</b>	Zingibéracées
<b>Genre</b>	<i>Alpinia</i>
<b>Espèce</b>	<i>Officinarum</i>

### II-5-Etymologie des mots galanga et Alpinia

Le nom vernaculaire galanga et ses dérivés proviennent probablement de la traduction arabe 'khanlanjan' du nom chinois 'liang-jiang', signifiant en anglais 'mild ginger' que l'on peut traduire en français par gingembre doux. Dans le langage indien, le nom sanskrit 'kulanja' a la même origine, tout comme ses dérivés : 'kulinjan,

kulanja'. Le nom de genre *Alpinia* rappelle le nom du botaniste italien Prospero Alpina (1533-1617). (**Gernot Katzer's Spice Pages - janvier 2005**).

### **III-Les antibiotiques**

Les antibiotiques, au sens strict, sont des produits élaborés par des micro-organismes, mais on inclut généralement parmi eux les dérivés semi-synthétiques et les produits entièrement synthétiques. La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques qui inhibent sélectivement certaines voies métaboliques des bactéries, sans exercer habituellement d'effets toxiques pour les organismes supérieurs. Cette propriété les distingue des antiseptiques (**Bergogne-Berezin et Dellamonica, 1995**).

#### **III-1-Les cibles bactériennes des antibiotiques**

Les cibles des antibiotiques sont impliquées dans les fonctions physiologiques ou métaboliques de la bactérie. Les antibiotiques peuvent inhiber la biosynthèse des acides nucléiques (ADN et ARN), mais leurs cibles principales sont la paroi cellulaire et les ribosomes bactériens (**Singh et Barrett, 2006**).

#### **III-2-L'antibiogramme**

Le but de la réalisation d'un antibiogramme est de prédire la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques dans une optique essentiellement thérapeutique. Il sert également :

- À la surveillance épidémiologique de la résistance bactérienne
- À l'identification bactérienne par la mise en évidence de résistances naturelles.

(**BURNICHON Nelly et TEXIER Anthony ;2003**)

##### **III-2-1-Notion du bactériostatique et du bactéricide**

Quand l'ATB inhibe seulement la croissance des bactéries, on parle ici de l'effet bactériostatique, mais lorsque l'ATB provoque la mort des bactéries on parle de l'effet bactéricide (**Haddouchi et al., 1999**).

##### **• L'effet bactériostatique**

C'est une activité bactérienne au cours de laquelle il ne se manifeste aucune destruction bactérienne, on remarque une inhibition de la croissance bactérienne, croissance qui reprend dès que la substance disparaît.

En limitant la croissance bactérienne, la molécule permet aux défenses naturelles de l'organisme d'entrer en jeu sans être dépassées.

L'effet bactériostatique d'une molécule est évalué par la concentration minimale inhibitrice. Pour une souche donnée, la CMI est la plus faible concentration inhibitrice d'antibiotique pour laquelle il n'a plus des germes microbiens visibles (Muanda, 2010).

### • L'effet bactéricide

C'est un effet qui se manifeste par une accélération de la mort des bactéries aux concentrations d'ATB utilisées *in vivo* ou *in vitro*; s'il persiste moins de 0,01% de survivants après 18 h de culture (Muanda, 2010).

L'effet bactéricide et bactériostatique est réalisé *in vitro* par le CMI et CMB.

Antibiotiques			Familles	Cibles
Noms	Symbole	Quantité par disque		
Cefalexine	CP	30 µg	beta-lactamines	Synthèse de peptidoglycane
Cefazoline	CZ	30 µg		
Oxacilline	OX	05 µg		
Cefoxitine	FOX	30 µg		
Ceftazydime	CAZ	30 µg		
Cefixime	CFM	05 UI		
Amoxicilline	AX	25 µg		
Pénicilline	P	10 UI		
Imipénème	IMP	10 µg		
Tétracycline	T	30 µg	Tétracycline	Synthèse protéique (Ribosome) ARN polymérase
Doxycycline	DO	30 µg	Aminoglycoside	
Gentamycine	CN	10 UI		
Tobramycine	TOB	10 µg		
Kanamycine	K	30 µg		
Amikacine	AK	30 µg		
Rifampicine	RA	05 µg	Rifamycines	
Spiramycine	SP	100 µg	Macrolides	
Bacitracine	B	10 UI	Polypeptides Gramicidines	Membrane
Nitrofurantoïne	F	300 µg	Nitrofuranes	la réplication de l'ADN ; ADN gyrase et topoisomérase
Ofloxacine	OFX	05 µg	Fluoroquinolones	
Nitroxoline	NTX	30 µg	Nitroquinolines	

Figure 08: exemple des disques d'antibiotiques leur familles et cibles.(T.benabou ;2012)

## IV-Description de la souche

### IV-1-Place du *S. aureus* dans le genre *Staphylococcus*

Le *S. aureus* est une espèce de staphylocoques qui n'est pas unique dans le genre *Staphylococcus*.

Une minorité de staphylocoques a été isolée chez l'espèce humaine, les autres espèces étant exclusivement retrouvées chez des espèces animales. Certaines des 18 espèces staphylococciques isolées chez l'Homme sont pathogènes et peuvent donc entraîner des infections. Le genre *Staphylococcus* regroupe donc des espèces connues comme *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* ou *S. capitis*. A l'heure actuelle, il y a 47 espèces et 24 sous espèces dans le genre *Staphylococcus* (**bactéριο.cict.fr ;2013**).

### **IV-2- Caractères bactériologiques**

#### **IV-2-1- Morphologie**

On retrouve les staphylocoques en amas irréguliers de bactéries ou regroupés par deux (diplocoques) ou par quatre (tétraèdres) (Figure08 ).

Ces petits amas forment souvent des grappes et c'est grâce à l'examen direct que la bactérie a été nommée par Ogston (1884). En effet, son nom dérive du grec «staphyle» qui signifie tout simplement grappe de raisin.

Les staphylocoques ont été observés par Robert Koch (1878) puis reconnus par Louis Pasteur (1880) et après une coloration de Gram, ils se révèlent être des cocci Gram positif, d'environ 0,5 à 1 µm de diamètre. Ils sont immobiles, non sporulés.

La majorité des *S. aureus* sont capsulés mais ils peuvent perdre leur capsule après culture.



Figure09 : Coloration de Gram de *S. aureus* (Williams ;1963).

#### **IV-2-1-1-Morphologie des colonies de *S. aureus***

Le *S. aureus* est une bactérie à croissance aéro-anaérobie facultative, et sa croissance sur milieu ordinaire est facile entre 10 et 45 °C. Sur une gélose profonde en tube, les bactéries cultivent tout au long du tube donc le caractère aéro-anaérobie facultatif est confirmé. Après 24h d'incubation, il peut *S. aureus* se développer sur géloses trypticase-soja supplémentées ou non en sang.

Les colonies observées sont alors lisses, opaques, convexes et rondes (à bord net). Leur diamètre est compris entre 1 et 3 mm et elles peuvent être pigmentées (Figure10).

Cette coloration a d'ailleurs donné le nom d' « aureus » à *S. aureus* car la pigmentation est souvent de couleur or (jaune à jaune orangée).



Figure 10: Culture de *S. aureus* sur gélose au sang. (Robert;2013)

### **IV-2-2-Habitat**

#### **IV-2-2-1-Dans l'environnement**

Le *S. aureus* est une bactérie qui est répandue sur la planète bleue de façon ubiquitaire.

Il possède des capacités d'adaptation et de résistance au stress importantes et il est capable de survivre dans un large éventail d'habitats environnementaux.

Ces capacités expliquent en partie la difficulté à éradiquer *S. aureus*. La bactérie peut être isolée de façon sporadique dans le sol, l'eau douce, le sable de la plage, l'eau de mer, la surface des plantes. Concrètement, elle est largement présente dans les poussières dispersées dans l'air et les surfaces (**Dworkin.M et all ;2006**).

Les difficultés d'éradication du micro-organisme posent un problème en milieu hospitalier car les personnes hospitalisées peuvent être infectées par des *S. aureus* qui sont d'origine généralement humaine. Ces personnes se retrouvent contaminées par contact direct, par des aérosols, ou bien à partir de surfaces contaminées.

Une étude a déterminé que durant une période de 18 mois, 64 % des échantillons d'air prélevés dans un bloc opératoire en activité (durant les opérations) étaient contaminés par *S. aureus* (**Edmiston Jr ;2005**).

### IV-2-2-2-Chez l'homme

*S. aureus* est présent sur plusieurs sites corporels. On le repère sur la surface de la peau et des muqueuses, mais il colonise principalement les fosses nasales, les glandes de la peau, le cuir chevelu, les mains, la bouche, les dents et le périnée (**Kloos et al ; 1976**) ([**Williams ; 1963**) (**Smith ; 2001**).

La colonisation de ce micro-organisme, n'induit pas forcément une pathologie puisqu'il existe des porteurs sains dans la population générale. La fréquence du portage sain chez les humains est approximativement de 30 %, cette fréquence diffère selon plusieurs paramètres comme par exemple le site de la colonisation (23 à 46 % au niveau du nez (**Amir et al ;2006**), 24 à 36 % au niveau de la bouche (**Smith ;2001**) ou l'âge (jusqu'à 64 % chez les enfants (**Waston et al ;2006**).

*S. aureus* peut donc, à partir de ces réservoirs, infecter les lésions cutanées, les glandes mammaires et les muqueuses intestinales ou génitales.

Certains facteurs de risque de portage de *S. aureus* ont été identifiés comme les phototypes blancs , le sexe masculin , les diabétiques , les insuffisants hépatiques , les personnes présentant des problèmes cutanés , les sujets séropositifs pour le VIH (**Williams ;1963**) (**Nguyen et al ;1999**) ou encore les personnes dialysées (**Williams ;1963**) (**Yu et al ;1986**) sont plus à risque d'être porteurs de la bactérie et de développer une infection.

### IV-3-Pouvoir pathogène de *S. aureus*

*S. aureus* provoque deux types de syndromes :

Les toxémies staphylococciques et les infections suppuratives. Les toxémies sont dues à des toxines produites par la souche in vivo une fois installée chez l'hôte (TSST1 et exfoliatines) ou des toxines produites par la souche dans un environnement autre que l'hôte puis ingérées par l'organisme (entérotoxines dans les aliments).

En effet, l'ingestion de toxine en dehors de toute cellule bactérienne suffit à reproduire la maladie. Les infections suppuratives impliquent la prolifération bactérienne, l'invasion, la destruction des tissus de l'hôte et la réponse inflammatoire locale et systémique.

*S.aureus* est responsable d'infections au niveau de la peau, des articulations, des os et des systèmes vasculaire et respiratoire.

Il est également responsable d'infections superficielles cutanées, sous-cutanées et muqueuses telles que les furoncles, panaris impétigo, abcès, cellulites ou lymphangites.

*S.aureus* est la principale cause d'ostéomyélites, de méningites, d'endocardites infectieuses et d'arthrites septiques.

*S.aureus* est un pathogène majeur impliqué dans les infections respiratoires communautaires et nosocomiales. Il est décrit comme capable d'adhérer aux mucines respiratoires (**Boden et al ; 1989**).

L'affinité et le niveau d'expression des andésines responsables des interactions avec les mucines varient en fonction des souches de *S.aureus* (**Kawabata et al ; 1985**).

*S.aureus* est le premier pathogène isolé dans le tractus respiratoire des enfants atteints de mucoviscidose. Ulrich et al, ont montré que *S.aureus* adhère en priorité aux composés du mucus de l'épithélium respiratoire sans différence significative de l'adhérence de *S.aureus* sur l'épithélium respiratoire CF et nonCF (**Verdier et al ; 2012**).

Schwab et al, ont montré, sur des lignées de cellules épithéliales bronchiques, que l'adhérence des souches CF de *S.aureus* est plus élevée que l'adhérence de souches non-CF (**Medstudenti et al ; 2012**).

#### **IV-4-S. aureus résistant à la méticilline SARM ou MRSA**

La résistance de *S. aureus* aux antimicrobiens est apparue rapidement dans l'histoire des antibiotiques.

C'est ainsi que dans l'année qui a suivi l'introduction de la pénicilline en 1949, ont été rapportés en milieu hospitalier, où la pression antimicrobienne est la plus importante, les premiers cas de *S. aureus* résistant de la même façon, 2 ans après l'apparition de la méticilline en 1959, le premier agent anti staphylococcique, les premiers *S. aureus* résistant à cet antibiotique ont été observés (**Infect Control ; 2004**).

Les *S. aureus* résistant à la méticilline(SARM) sont ceux ayant acquis une résistance chromosomique par le gène *mecA*, qui code pour une protéine de liaison à la pénicilline (PBP2a) ayant une affinité diminuée vis-à-vis des bêtalactamines.

Le gène *mecA* fait partie d'un matériel génétique mobile appelé staphylococcal cassette chromosome (SCC) *mec*, susceptible d'être transmis horizontalement d'une

bactérie à une autre au sein d'une même espèce, mais aussi d'une espèce à une autre , Ainsi l'élément SCC mec proviendrait initialement d'une espèce staphylococcique « coagulase négative » (**Jousselin ; 2005, Dworkin, M.200**)..

Les SARM ont une sensibilité très faible à l'ensemble des bêtalactamines et sont fréquemment résistants à d'autres familles d'antibiotiques du fait de différents mécanismes génétiques de résistance souvent associés (cf. « Antibiothérapie par voie générale »).

Les SARM initialement décrits en milieu hospitalier au début des années 1960 ont plus tard été identifiés en ville, en particulier à l'occasion d'infections concernant des patients « à risque » de portage de SARM, comme ceux ayant été hospitalisés récemment. Un certain nombre d'études ont permis d'identifier ces facteurs de risque dont les principaux sont résumés plus loin (**Jousselin ; 2005**).

### **IV-4-1-Facteurs de risque d'infection à *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM)**

- Hospitalisation dans les 2 ans précédents.
- Prise d'antibiotiques dans les 6 mois précédents.
- Diabète.
- Soins paramédicaux ambulatoires.
- Entourage travaillant dans une structure de soins.
- Immunodépression.
- Toxicomanie.

### **IV-4-2-Prévention des infections à SARM au laboratoire**

« La prévention des infection à SARM repose sur des mesures de précaution uniformisées visant à prévenir la transmission des infection en milieu de soins. En voici quelque exemples :

-lavage des mains : il faut se laver les mains immédiatement après avoir enlevées les gants entre les contacts avec différents patients et entre les taches et l'intervention ;

-lavage de gants : il faut porter des gants lorsqu'on manipule du sang, des liquides organiques et des articles contaminés. Les mains doivent être lavées immédiatement après avoir enlevé les gants et entre les contacts avec différents patients.

-port d'un masque et d'une blouse : il faut porter un masque, un écran facial et une blouse, lors de l'intervention qui risquent de causer des éclaboussures ou la projection de gouttelettes de sang ou de liquide organique.

-matériel servant aux soins des malades : il faut bien nettoyer, désinfecter et stériliser le matériel servant soigner les malades, de manière à limiter la contamination

-Il faut manipuler, transporter et laver la lingerie souillée de sang ou de liquides organiques, de façon à éviter tout contact avec la peau, ainsi que la contamination des vêtements et la transmission de microorganismes aux autres patients ».(camille ;2006).

L'objectif de ce travail est la mise en évidence de l'activité anti-SARM de l'extrait d'huile essentielle de *Alpinia officinarum*. Ce travail a été effectué au sein du laboratoire de département de biologie (l'Université Amar Thelidji Laghouat).

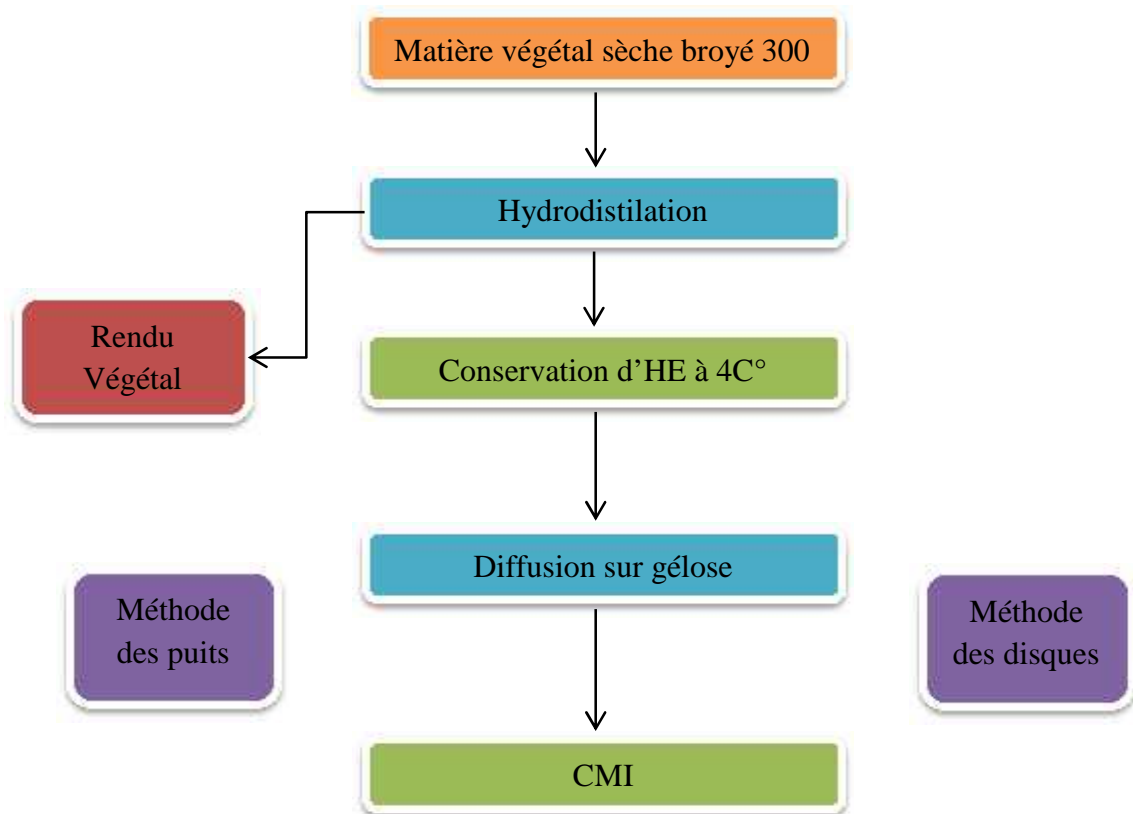


Figure11 : Démarche expérimentale suivie.

### II-1-Matériel végétal :

Le matériel ou l'organe végétal choisi dans la présente étude est représenté par les rhizomes sèches du «*Alpinia officinarum*». Parmi les critères de choix de ces rhizomes, figurent leur utilisation déjà dans la médecine traditionnelle, d'une part et le manque de travaux de recherche sur les propriétés biologiques en particulier le pouvoir antimicrobien de leurs huiles essentielles.

Les rhizomes ont été achetés, sous forme séchée, chez un herboriste de wilaya de Laghouat de la région de Wiam Elles ont été récupérées dans un sac propre pour servir ultérieurement à l'extraction.

Nous avons acheté 1kg de rhizomes La matière sèche a été broyée avant l'utilisation pour faciliter l'opération de l'extraction (Figure12).



Figure12: Rhizome sèche d'*A. officinarum*

### Milieux de cultures

- Gélose nutritive (milieu de repiquage de souches)
- Gélose Mueller Hinton (milieu de l'activité antibactérienne, puits, disque et CMI).
- Bouillon nutritif (milieu liquide de CMI).

### II-2-Le pré-test des souches bactériennes par méthode de puits et de disque

On a effectué des pré-tests dans le but de sélectionner les souches sensibles à l'huile essentielle de la plante étudiée.

Étalement de la souche par écouvillonnage sur la gélose Mueller-Hinton

- A l'aide d'une pince stérile, imbiber un disque de papier Watman (6 mm de diamètre) dans 10  $\mu$ l de l'huile essentielle pure puis le déposer au milieu de la géloseensemencée, les boîtes sont incubé à 37°C durant 24 heures.

- L'ensemencement des 3 souches bactériennes se fait par écouvillonnage, Après le séchage des boîtes la gélose est perforée (3puits) à l'aide de la partie supérieure d'une pipette Pasteur. Les cavités ainsi formées sont remplies par 50  $\mu$ L d'HE pure par puits.

-Les boîtes sont mises à incubées dans une étuve à 37°C pendant 24h.

Les souches testées sont : ATCC 43300

ATCC 25212

ATCC23



Figure13 : Souches microbiennes testées.

Tableau 2: les résultats de diamètres de la zone d'inhibition obtenu méthode disque et puits

Souche bactérien	Diamètre d'inhibition méthode des PUIITS (3puits)			Diamètre d'inhibition méthode des Disque (3disque)		
ATCC25212	-	-	-	-	-	-
ATCC43300	15.7	18.56	22.75	12.70	17.48	12.77
ATCC23	-	-	-	-	-	-
Moyenne	19.33			14.31		
Ecart type	3.53			2.74		



Figure14 : Exemple de l'effet d'inhibition de l'huile essentielle par la méthode des puits et/ou des disques

\*A partir du très bon résultat de pré-tests de diffusion sur gélose on a choisit la souche de MRSA+ comme un thème de notre étude.

### II-3-Origine de la souche bactérienne

La souche bactérienne choisie pour cette étude est une bactérie pathogène et impliquées fréquemment dans la contamination et l'altération des denrées alimentaires et leur résistance naturelle à divers types d'agents antimicrobiens. Bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus* MRSA+ATCC 43300)

Cette souche nous a été fournie par le service de laboratoire vétérinaire de la wilaya de Laghouat.



Figure 15 : la souche bactérienne *Staphylococcus aureus* (MRSA+) ATCC 43300

### II-4-Extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles est réalisée par hydrodistillation en utilisant un appareil de type Clevenger. Les rendements sont déterminés par rapport à la matière sèche.

### II-5-Description du dispositif d'extraction

L'appareil utilisé pour l'hydrodistillation est de type Clevenger, il est constitué d'une chauffe ballon qui permet la distribution homogène de la chaleur dans le ballon. Celui-ci est en général en verre pyrex dans lequel on place le matériel végétal séché et L'eau distillée, une colonne de condensation de la vapeur (réfrigérant) qui vient de l'échauffement du ballon, un collecteur qui reçoit les produits de la distillation.

### II-6-Méthode d'extraction de (HE) par hydrodistillation

Une hydrodistillation est assurée grâce à un appareil de type Clevenger, où 300 g de matière végétale sont introduites avec 1L 200 d'eau dans un ballon de 5 L. Après installation

et fermeture du montage, la mise en marche de la chauffe ballon est effectuée avec un réglage optimum du chauffage pour permettre une stabilité de l'extraction à une vitesse constante et bien maîtrisée.

La vapeur chargée d'huile essentielle arrive dans le condenseur. La durée totale de l'extraction est estimée à 3 h (jusqu'à ce qu'on obtient plus d'HE). L'huile essentielle se distingue de l'hydrolat (eau aromatique) par sa différence de densité et de couleur. Puis récupérée et conservée dans un tube, hermétiquement fermés et stockés dans un endroit frais (4°C) à l'abri de la lumière.



Figure16 : Montage de l'hydrodistillateur (Clevenger)

### II-7-Rendement en huile essentielle ( $R_{HE}$ ).

Selon la norme AFNOR (1986), le rendement en huile essentielle ( $R_{HE}$ ), est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue après extraction ( $M'$ ) et la masse de la matière végétale utilisée ( $M$ ).

Il est donné par la formule suivante :

$R_{HE}$  : rendement en huile essentielle des rhizomes de *A. officinarum*;

$M'$  : masse de l'huile essentielle obtenue en gramme;

$M$  : masse des rhizomes en gramme .

$$R_{HE} = M'/M.100$$

## II-8-Détermination de la sensibilité aux antibiotiques

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a été réalisée par la méthode de diffusion sur gélose Mueller-Hinton (MH) selon les recommandations du comité Européen de l'antibiogramme (**l'EUCAST, 2017**).

Le but de la réalisation d'un antibiogramme est de prédire la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques dans une optique essentiellement thérapeutique. Il sert également à :

- La surveillance épidémiologique de la résistance bactérienne.
- L'identification bactérienne par la mise en évidence de résistances naturelles

### II-8-1-Technique d'Antibiogramme :

➤ A partir d'une culture bactérienne (MRSA+) pure et jeune (de 24 h sur milieu gélosé nutritif nous avons réalisé une suspension en ensemençant une colonie bien isolée dans 10 ml d'eau physiologique à 0,9%, puis homogénéiser la suspension bactérienne au vortex, sa densité optique doit être de 0,08 à 0,1 à une longueur d'onde de 625nm équivalente à 0,5 Mac Farland.

➤ Ensemencer par écouvillonnage cette dilution par inondation sur les boîtes de pétri contenant le milieu de Müller-Hinton rejeter le surplus et laisser sécher les boîtes.

➤ Application de série des disques d'antibiotique (CTX, TIM, CIP, SXT, NA, AMP, IMI, CT, KZ, F, AK, FOS, CN FOX, AML.) à l'aide d'une pince stérile et déposés sur gélose MH préalablement ensemencée par écouvillonnage .

➤ Laisser les boîtes 20 minutes à température ambiante pour permettre une pré-diffusion de l'antibiotique, puis les incuber pendant 18-24 heures à 37°C.

### II-8-2-Lecture

➤ La lecture se fait en mesurant avec précision les différents diamètres des zones d'inhibition. Comparer ces résultats aux valeurs critiques figurant dans l'Annexe et classer les bactéries dans l'une des catégories: S(Sensible),I( Intermédiaire) et R( Résistante).

Tableau 03 : Liste de quelque ATB testé pour la souche de MRSA+

Abréviation	Antibiotique	Charge ( $\mu\text{g}$ )	Famille	Diamètre critique (mm)	
				S	R
FOX	Céfoxitine	30	B-lactamine	22	21
CIP	Ciprofloxacine	5	Fluoroquinolones	21	15
F	Nitrofurantoïne	300	Nitrofuranes	25	31
CN	gentamycine	104	aminoglycoside	12	18

## II-9-Evaluation de l'activité antibactérienne

Le test de susceptibilité des huiles essentielles et des extraits de rhizome séché est effectué selon deux méthodes différentes: la méthode de diffusion sur disque et la méthode des puits en milieu de Mueller-Hinton.

Une telle stratégie nous permet par la suite d'apprécier le pouvoir antibactérien de notre extrait vis-à-vis de la souche MRST tout en déterminant également la concentration inhibitrice minimale (CMI) à partir d'une gamme de concentrations dans des milieux de culture convenables.

### II-9-1-Préparation des dilutions d'huile essentielle

Afin d'obtenir différentes concentrations de l'huile essentielle des rhizomes d'*Alpinia officinarum*, nous avons diluée l'huile essentielle pure dans le DMSO (figure 17); un solvant moyennement polaire et ne présentant aucun pouvoir antibactérien puissant. Une telle déduction est en accord avec les travaux d'Alavi *et al.* (2005) Mohammadi (2006) et Ownagh *et al.* (2010).

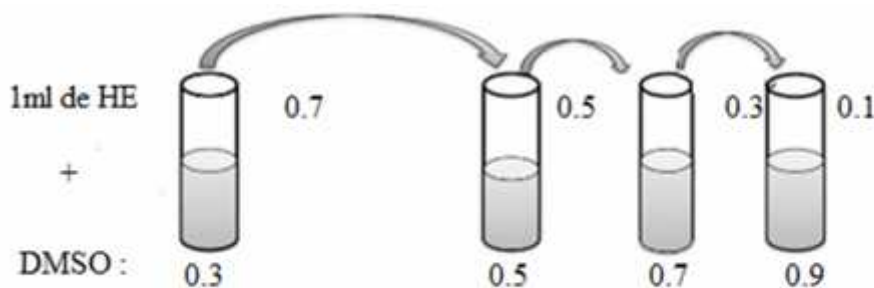


Figure 17 : Dilution de l'HE dans le Diméthylsulfoxyde (DMSO)

### II-9-2-Méthode des disques

L'aromatogramme est une méthode inspirée de l'antibiogramme, il permet de déterminer l'activité inhibitrice de l'huile essentielle par mesure du diamètre d'inhibition, autour d'un disque imprégné de celui-ci, ou d'un produit à base d'huile essentielle (Vincent, 1991).

Nous avons appliqué la technique par contact direct de l'aromatogramme pour évaluer l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle.

Ce test est effectué par dépôt d'un disque stérile de 6 mm de diamètre (Whatman N°1), (3disques/boite) imprégné d'une quantité d'HE (10 µL) pure et diluée (figure17) sur un milieu gélosé(MH) l'ensemencement s'est fait par écouvillonnage en présence de la culture microbienne de MRSA+.

Après incubation, l'interprétation des des résultats se fait par mesure des diamètres des zones d'inhibition en millimètres en utilisant un pied à coulisse (figure 18 )

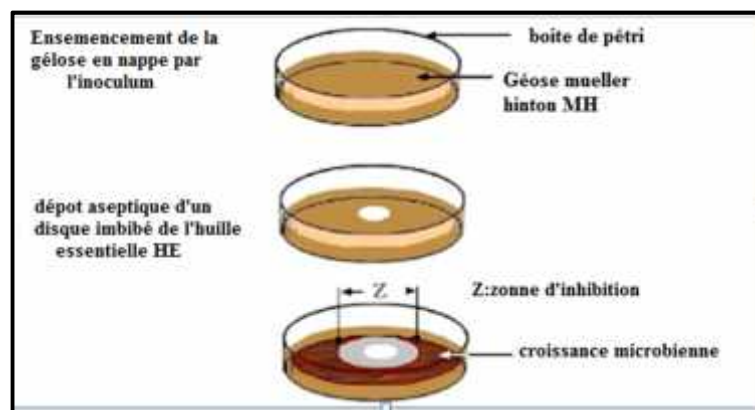


Figure18 : Illustration de la méthode d'aromatogramme (ZAIKI, 1988).

### II-9-3-Méthode de puits

C'est la technique de base utilisée pour étudier la capacité d'une substance à exercer un effet anti microbien, elle est aussi appelée : la technique de dilution en gélose pour la détermination des extraits actifs.

Des boîtes de Pétri contenant du milieu Mueller Hinton agar sont ensemencées aseptiquement par une suspension de 0.5 MC Farland lue à 625nm qui provient d'une culture jeune de bactérie. L'ensemencement se fait par écouvillonnage, Après le séchage des boîtes, la gélose est perforée au centre à l'aide de la partie supérieure d'une pipette Pasteur. Les cavités ainsi formées sont remplies par l'HE pure et diluée (50 µL par puits). Les boîtes sont mises à incubées dans une étuve à 37°C pendant 24h.

L'action inhibitrice se manifeste par la formation d'une auréole autour des puits, Et lecture des résultats s'effectue par mesure des diamètres des zones d'inhibitions.

Un produit est considéré actif, si le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur à 8 mm (ELA et coll.,1996).

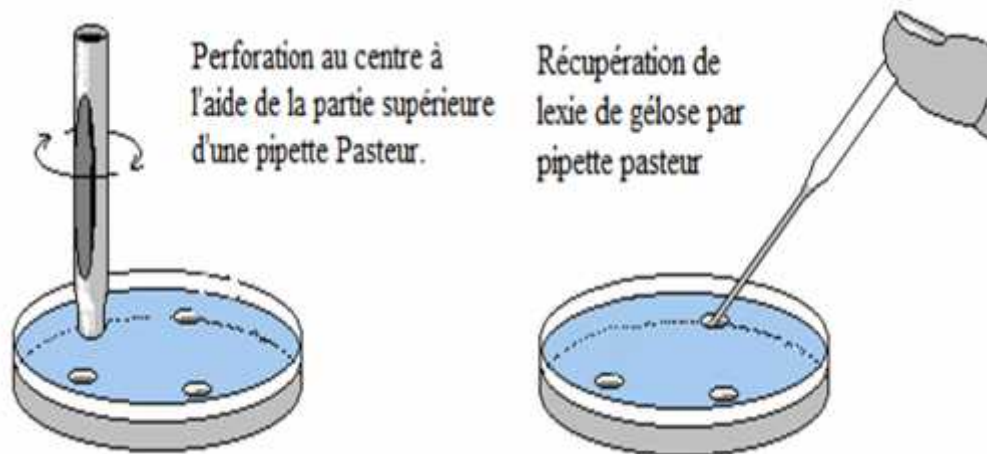


Figure19 : Méthode de puits

### II-9-4-Conservation des souches

Le repiquage se fait sur la pente d'une gélose inclinée en tube hermétiquement clos, on ensemence le tube avec une colonie bien isolée de la souche purifiée en utilisant une anse de platine préalablement flambée et en faisant des stries sur la surface inclinée, puis le tube est incubé à 37°C pendant 18-24 heures. Après récupération, le tube est conservé à une température de 4 à 6°C. Le repiquage doit se renouveler en continu chaque mois.

### II-10-Méthode de détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) sur milieu liquide :

Cette méthode permet la détermination de la CMI à partir d'une gamme de concentrations de la substance antimicrobienne en milieu liquide bouillon nutritif.

Le Bouillon cœur cerveau est le milieu d'enrichissement pour toutes les souches bactériennes (Benkeblia, 2004).

Les essais de détermination de la CMI sont effectués selon la méthode de dilution standard sur milieu liquide bouillon nutritif des séries de dilutions de solution mère (250µl.200 µl.150 µl.100 µl.75 µl.50 µl.25 µl.10µl. 5 µl.) Sont réalisées avec le DMSO ,9ml de bouillon nutritif plus une concentration de (0.5% de tween 80) et de200µl de l'inoculum a chaque tube .Le mélange est immédiatement agité par vortex.

La CMI de l'extrait est définie à partir de premier tube de la gamme dépourvue de croissance microbienne (NCCLS, 1999) de même, une incubation sur un milieu MH pour 24 heures à 37°C a été de plus effectuée pour confirmer les observations visuelles.

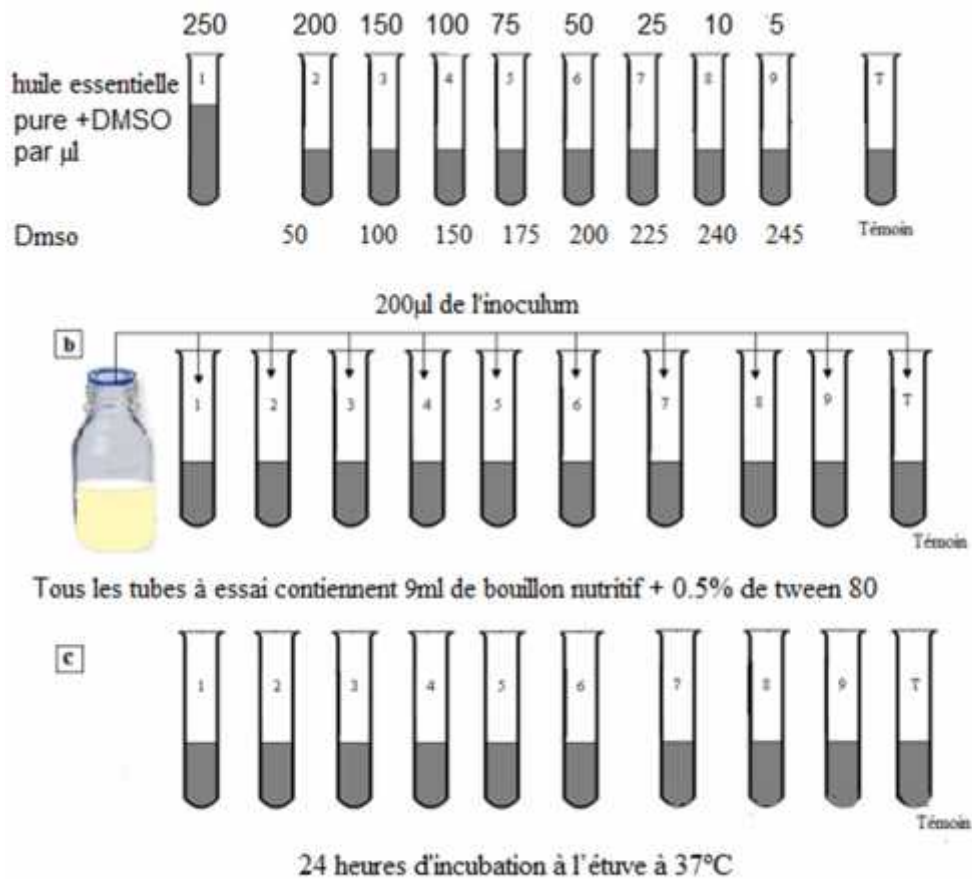


Figure 20 : Méthode de la détermination de CMI en milieu liquide

Pour vérifier notre résultat de CMI obtenu en milieu liquide on a le déterminé on milieu solide de MH (Muller – Hinton) ensemencées par 20 µl de chaque tube des dilutions de CMI.

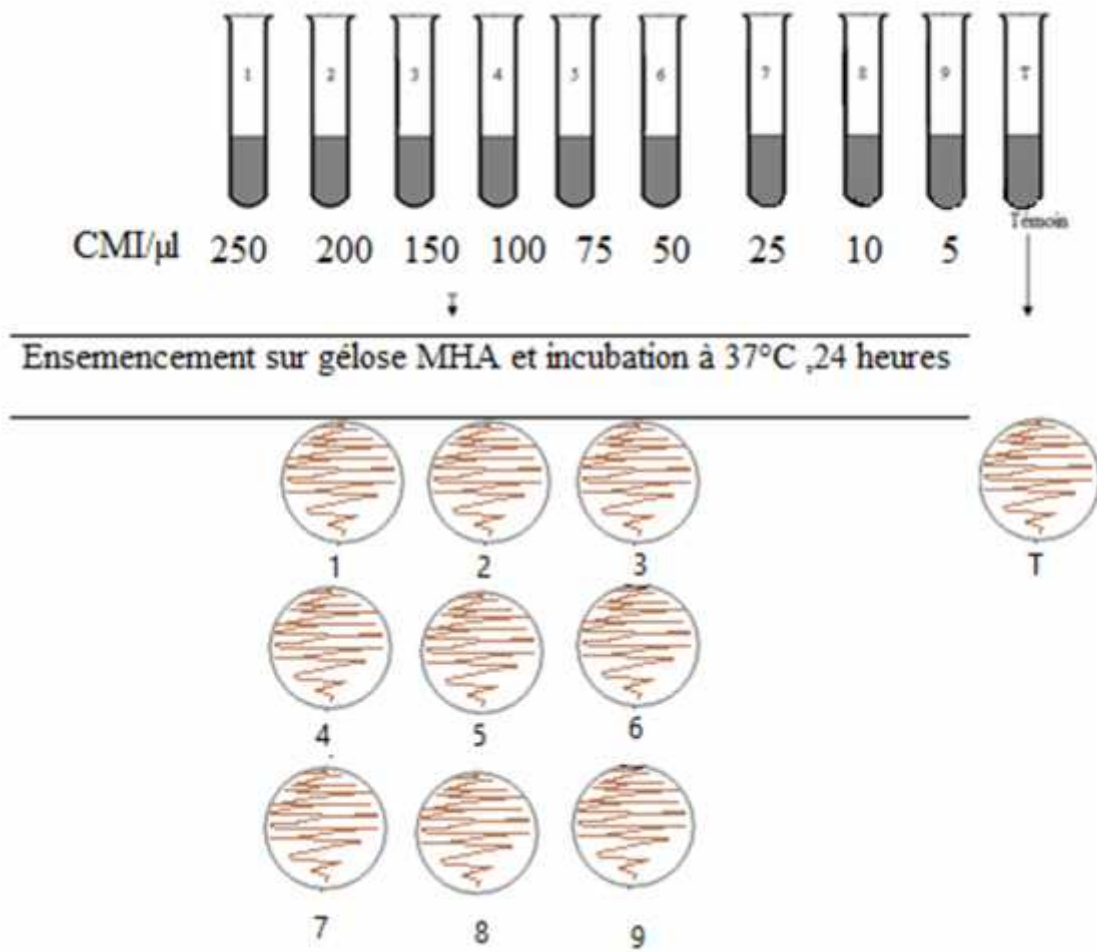


Figure21 : Méthode de la détermination de CMI en milieu solide

### III-Expression des résultats

#### III-1-Propriétés organoleptiques de l'extrait

Les rhizomes sont soumis à une hydrodistillation pendant 3h, les extraits obtenus sont des substances hautement volatiles, d'une odeur aromatique, douce, et de couleur jaune pâle en accord avec les normes AFNOR(1998)



Figure22 :L'huile essentielle pure après extraction.

#### III-2-Rendement

D'après les résultats obtenus, les rendements moyens en huile essentielle ont été calculés par rapport à la plante séchée d'*Alpinia officinarum* à donner un rendement primaire de 0.61% et la 2eme extraction de 0.46% et pour la 3eme 0.47 % (tableau04).

Tableau04: Rendement en huile essentielle de *Alpinia officinarum* .

<b>Quantité de la biomasse(g)</b>	300	400	300
<b>Volume de HE (ml)</b>	1.83	1.9	1.4
<b>Temps d'extraction(h)</b>	3	3	3
<b>Rendement (%)</b>	0.61	0.46	0.47

L'huile totale a donné un faible rendement, et on a une différence entre les 3 extractions Ceci montre que certains facteurs tels que : la nature du sol, le climat, la qualité de la matière végétale utilisée peuvent influencer la sécrétion d'huiles essentielles chez une plante.

### III-3-Antibiogramme

L'antibiogramme a été réalisé pour la souche de MRSA + vis-à-vis de 15 antibiotiques de différentes familles.

La mesure de diamètre de la zone d'inhibition de la souche pour chacun des antibiotiques testés permet de caractériser la souche comme étant sensible ou résistante dont nous avons considéré que le diamètre de 10 mm est la limite entre résistance et sensibilité. Les résultats ainsi obtenus sont regroupés sous forme de photos (figure 24) et/ou récapitulés dans le tableau 5.



ATB (AML, F)



ATB (AK, CT)



ATB(FOX,KZ)



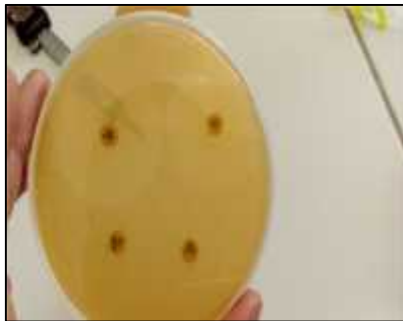
ATB(CIP,NA)



ATB (FOS)



ATB (AML,f)



ATB (f,AML)



ATB (CIP,AML)

Figures 23 : Résultats obtenu des différent antibiotiques testée (d'antibiogramme)

Tableau 05 : Diamètre d'inhibition de la souche de MRSA+ vis à vis 15 antibiotique.

ATB	Diamètre (mm)		moyenne
CTX	11,48	11,68	11,58
TIM	R	R	R
CIP	29,55	30,2	29,875
SXT	31,07	30,79	30,93
NA	R	R	R
AMP	R	R	R
IMI	R	R	R
CT	R	R	R
KZ	22,08	23,5	22,79
F	36,32	35,53	35,925
AK	18,77	19,11	18,94
FOS	25,96	28,63	27,295
CN	23,75	24,62	24,185
FOX	9,99	9,1	9,545
AML	R	R	R

Un tel test considéré comme étant témoin positif nous a conduits aux déductions suivantes :

-1<sup>er</sup> cas : Culture au contact du disque : pas de zone d'inhibition visible rendant la souche «résistante» c'est le cas de plus de 6 antibiotique (AML, CT, TIM, NA, AMP, IMI).

-2<sup>ème</sup> cas : Une zone plus grande est visible autour du disque de Nitrofurantoïne (F) avec un diamètre de 35.92 ce qui lui rend le plus puissant ATB testé. En revanche une efficacité plus ou moins faible a été trouvé dans l'ordre décroissant suivant : SXT, CIP, FOS, CN KZ, AK CTX , FOX.

- D'après le comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie La sensibilité des staphylocoques qui n'ont pas de concentration critique ne doit pas être utilisée pour le traitement des infections staphylococciques, Et La CMI doit être réalisée pour déterminer la sensibilité.

La résistance bactérienne aux antibiotiques se développe rapidement dans le monde et devient un problème crucial non seulement pour la médecine humaine, mais aussi pour la médecine vétérinaire. L'émergence de cette résistance chez les animaux et leurs produits a mis en lumière l'intérêt considérable du transfert potentiel de résistance à la population humaine via la chaîne alimentaire (**Vasquez et al., 2017**).

La souche MRST présente entre autres une résistance et/o une sensibilité moyenne vis-à-vis d'une large gamme des antibiotiques. L'accroissement des infections bactériennes, notamment celles qui sont dues au développement des souches résistantes au médicament utilisé soulignent la nécessité de la découverte de nouveaux agents antibactériens (**Gloedani et Kaloustian, 2006**).

### III-4-Aromatogramme

L'activité antibactérienne se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du disque de papier imprégné d'extrait brut étudié. Le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'une bactérie à une autre et d'un extrait à un autre.

La variation de l'activité antimicrobienne des extraits expliquent les variations de leurs compositions chimiques. Comme cela a été rapporté dans la littérature, nous avons considéré qu'un extrait a une activité antibactérienne si son diamètre d'inhibition est supérieur à 10mm. (**Ponce et al., 2003**).(tableau 6)

D'une manière générale, leur action se déroule en trois phases :

**I.** Attaque de la paroi bactérienne par l'huile essentielle, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires.

**II.** Acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure.

**III.** Destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie.

Tableau 06 : L'effet de l'extrait sur MRSA+ (méthode des disques).

Délutions	Diamètre d'inhibition (mm)		
SM	16.85	18.00	17.00
1	11.26	11.59	10.09
2	9.58	9.57	9.53
3	8.16	8.82	9.60
4	-	-	-

Pour une bonne comparaison des résultats, nous avons tracé de même l'histogramme suivant :

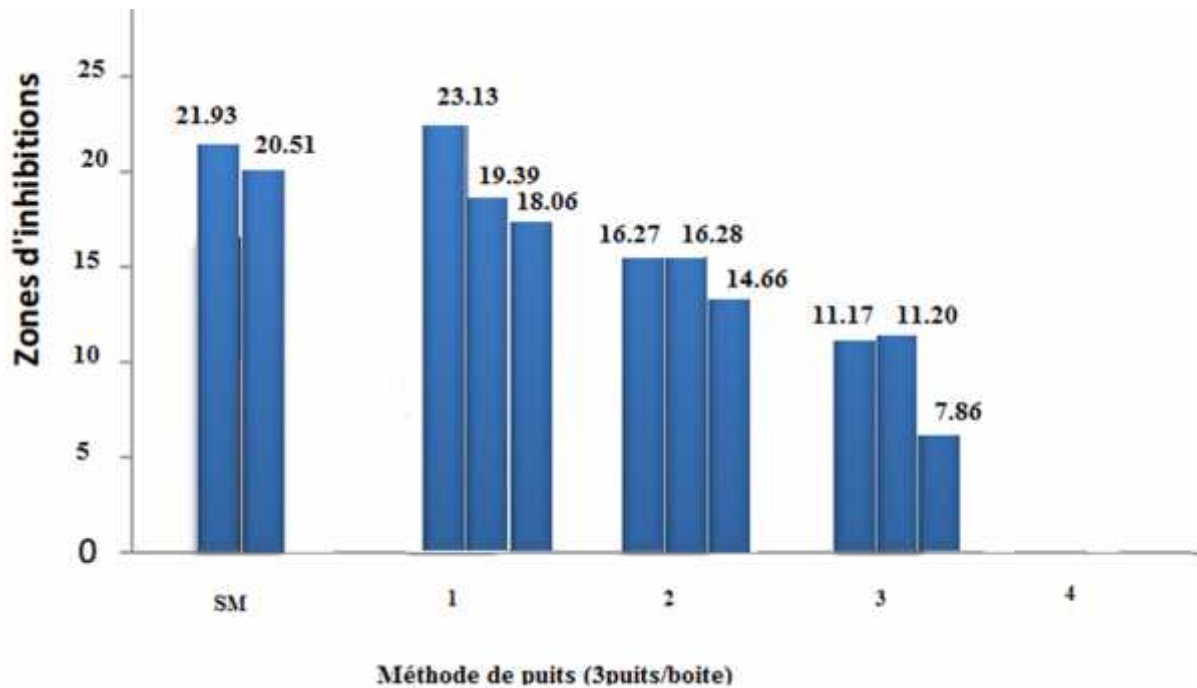


Figure24 : Diagramme de l'effet de l'extrait sur MRSA+ (méthode des puits).

D'après le tableau et la figure, notre CMI c'est la 3eme colonne et la série N°3 des puits, La plus grande surface d'inhibition est enregistrée par la solution mère (SM) de plus de 21.93 de diamètre, en utilisant la méthode de puits, par contre On a remarqué un disque fermée au série de dilution N°4

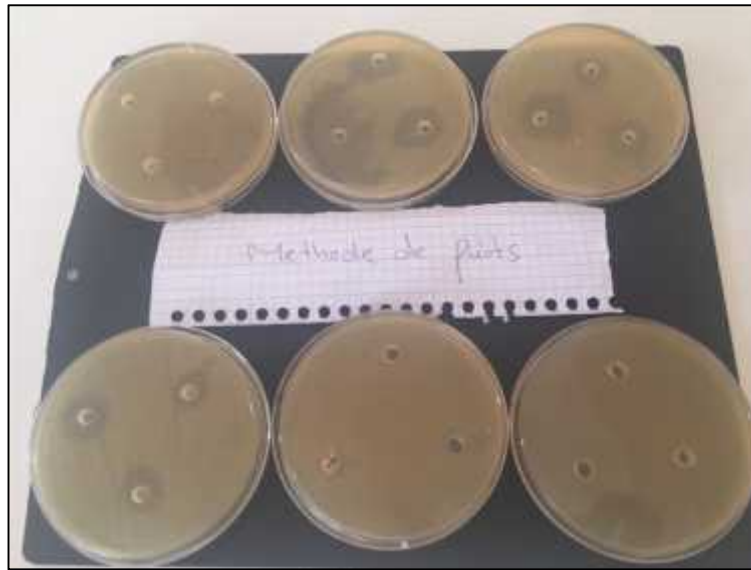


Figure 25: L'effet de l'extrait sur la souche de MRSA+ (méthode des puits).



Figure 26: L'effet de l'extrait sur la souche de MRSA+ (méthode des disques).

Les résultats obtenus (figure 26,27) montrent que notre espèce bactérienne étudiée (MRSA+) présentent des degrés de sensibilité différente vis-à-vis l'extraits étudiée de *Alpinia officinarum*.

L'extrait a réagi positivement avec notre souche microbienne testée dans les 2 méthodes ce qui confirme que la plante de *Alpinia officinarum* est douée de propriété antibactérienne très appréciable. L'efficacité optimale d'un extrait peut ne pas être due à un constituant actif principal, mais à l'action combinée (synergie) de différents composé de l'origine de cet extrait. Une étude complémentaire visant l'identification de la composition de notre extrait semble être recommandée.

D'après les résultats présentés, on remarque que la méthode des puits et la méthode des disques donnent presque des résultats similaire de l'activité antibactérienne anti MRSA, les

résultats montrent que la méthode des puits a donné des diamètres d'inhibition supérieurs à celle trouvée dans la méthode des disques grâce aux différents volumes utilisés dans la méthode des puits est supérieure de celle de la méthode des disques.

Selon les résultats des deux méthodes (puits et disque), l'extrait de notre plante agit fortement sur les bactéries Gram+ d'espèce MRSA.

L'activité antibactérienne de la plante est due aux différents agents chimiques présents dans ces extraits, y compris les huiles essentielles, les flavonoïdes, les tannins et les triterpénoïdes ainsi que d'autres composés de nature phénolique ou groupes hydroxyle libre, qui sont classifiés comme composés antibiotiques très actifs (**Essawi et Srour, 2000**).

Les polyphénols notamment les flavonoïdes et les tanins sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes.

Nos résultats sont en accord avec les travaux de **Huang et al (2008)** qui ont rapporté que l'extrait de rhizome de la plante *d'Alpinia officinarum* inhibe efficacement *Staphylococcus aureus*, *alpha-Hémolytique streptococcus*, *beta-Hémolytique streptococcus* et *Streptococcus pneumoniae* en inhibant l'enzyme bêta-ketoacyl-ACP réductase, une enzyme clé dans la synthèse des acides gras chez les bactéries et catalyse aussi la réduction de bêta-ketoacyl-ACP.

De même, **Zhang et al (2010)** ont examiné l'activité antibactérienne de l'huile essentielle *d'Alpinia officinarum* vis-à-vis *Helicobacter pylori* et ont pu même identifier les composés actifs ayant un tel effet dont ils ont mentionné qu'il s'agissait de trois diarylheptanoïdes (4,5-dihydroxy-3-méthoxyphényl)-1-phényl-4-heptène-3-one (1), 1,7-diphényl-5-heptène-3-one (2) et 4-phényl-1,7-diphényl-1-heptène-3,5-dione (3).

**Sun et al (2016)** à leur tour ont rédigé récemment une revue détaillée en récapitulant les activités biologiques et la biosynthèse de Diarylheptanoïdes à partir de la plante *Alpinia officinarum*

### III-5-Concentration minimale inhibitrice CMI :

L'obtention d'une trouble blanchâtre indique une multiplication bactérienne. La persistance de la couleur jaune initiale d'HE signifie l'absence de croissance du germe.

La CMI est égale alors à la plus petite concentration qui n'a pas montré un changement de couleur (Peskin et Winterbourn, 2000, Sharma *et al.*, 2012).



Figure 27: résultat de CMI sur milieu liquide.

L'interprétation des résultats est effectuée en fonction de l'absence ou de la présence de turbidité dans chaque cupule. La CMI est donc la plus petite concentration où le fluide a été trop clair.

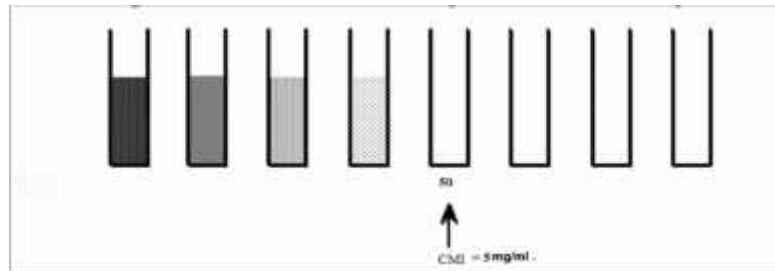


Figure 28 : La CMI de la souche testée est de 50  $\mu$ l (premier tube dans lequel aucune croissance n'est visible à l'œil nu).

Après comparaison visuelle avec un témoin équivalent, l'analyse des résultats montrent que les extraits d'*Alpinia officinarum* présente une activité antibactérienne acceptable. En effet, pour la souche étudiée de MRSA, notre CMI semble être le tube n°3 de concentration 50 $\mu$ l notre CMI=5mg/ml.

Pour d'autres auteurs si les valeurs de CMB sont équivalentes aux valeurs de CMI cela implique que l'effet est **bactéricide**, et si les valeurs de CMB sont plus élevées aux valeurs de CMI cela signifie que l'effet est **bactériostatique** (Cosentino et Tuberoso, 1999 ;Randrianarivelo, 2010).

Ainsi, les bactéries n'ont montré aucune croissance en présence des solutions mères des extraits. Cette concentration est donc inhibitrice pour notre souche.

Zaika (1988), et Ali Shtayeh *et al.*, (1988) ont affirmé que les bactéries à Gram+ sont plus résistantes aux extraits végétaux que les bactéries à Gram-.

Ces affirmations n'ont cependant pas été confirmées par d'autres travaux, la susceptibilité des bactéries est en effet indépendante du Gram (**Dorman et Deans, 2000**), on dépend des extraits utilisés (**Dean et Ritchie, 1987**). Ceci explique le changement de l'activité antibactérienne en modifiant la concentration de l'huile essentielle.

(**Ouibrahim.A.,2015**) a réalisé un travail intitulé Evaluation de l'effet antimicrobien et antioxydant de trois plantes aromatiques (*Laurus nobilis* L., *Ocimum basilicum* L. et *Rosmarinus officinalis* L.) de l'Est Algérien.

D'après le tableau suivant on constate que la souche bactérienne testée (MRSA) a une sensibilité modérée vis-à-vis des quatre extraits.

Les Concentrations minimales inhibitrices (CMI) des quatre extraits de plantes ont été évaluées contre *S. aureus* résistant à la méthicilline (MRSA) in vitro, montrant l'activité antimicrobienne suivante :

-L'HE *Laurus nobilis* L montre une activité faible par rapport à notre extrait.

-La deuxième espèce de *O. basilicum*, a montré une CMI=9.5 supérieure à notre concentration de 5mg/ml.

- On a noté que l'HE *Rosmarinus officinalis* L a une activité proche à notre concentration minimale inhibitrice.

Tous les trois extraits ont montré une sensibilité modérée à une puissante activité antibactérienne contre *S.aureus* résistante à la méthicilline (MRSA).

Ce qui nous amène à dire que l'extrait d'*Alpinia officinarum* capable d'inhiber la croissance de (MRSA).

Tableau 7: Concentration minimale inhibitrice (CMI) de quatre extraits végétaux contre *Staphylococcus aureus* et résistant à la méthicilline. *S. aureus* (SARM).

Souche bactérienne	CMI mg/ml				Références
	<i>Laurus nobilis</i> L	<i>Ocimum basilicum</i> L	<i>Rosmarinus officinalis</i> L	<i>Alpinia officinarum</i>	
<b>S. aureus résistante à la méthicilline - (MRSA)</b>	2.72	9.5	6.1	5	<b>(Ouibrahim ;2015).</b>

### III-6-Résultats de CMI sur milieu solide



Figure 29 : Résultat obtenue de CMI sur milieu solide MH.



Figure 30 : résultat finale de CMI corresponde à la concentration de 50  $\mu$ l (milieu liquide et solide)

La CMI au milieu solide montrent les mêmes résultats au CMI sur milieu liquide et toujours la CMI c'est la dilution 50 $\mu$ l (figure30), Plus la concentration est élevée la charge bactérienne diminuée comme montrant la (figure29).

L'activité antimicrobienne de l'extrait de plante est due aux différents agents chimiques présents dans cet extrait.



## A

**Alavi S.H.R., Yassa N. and Fazeli M.R.,(2005).** Chemical constituents and antibacterial activity of essential oil of *Peucedanum ruthenicum* M. Bieb. Fruits. *SHR IJPS* 1 (4): pp. 217-222.

**Alessandra Moro Buronzo.(2008).** grande guide des huiles essentielles santé beauté bien-être, Hachette pratique France, 205.

**Ali-Shtayeh MS, Yaghmour R, Faidi, Y, Salem K and Al-Nuri M (1998).**

Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the palestinian area. *J Ethnopharmacol*, pp.60 : 265-271. **DORMAN H.J.D., (2000).** Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oil. *Journal of Applied Microbiology*.pp. 88-308-316.

**Amir, LH., Garland, SM., Lumley, J. A case(2006)-control study of mastitis: nasal carriage of *Staphylococcus aureus*. *BMC Fam Pract.*; pp.11, p57.**

**Asma Farhat, (5 Novembre 2010),** Thèse sur : Vapo-Diffusion assistée par Micro-ondes : Conception, Optimisation et Application, l'université d'Avignon et des Pays de Vaucluse et

L'Ecole Nationale d'Ingénieurs de Gabès Marseille, pp. 18-32.

**AYAIDIA Boutheina .,(2011).** Etude comparative de trois variétés d'huiles essentielles de menthe dans la région de Ouargla. :pp73/77.

## B

**B.BAYALA. ;2014.,** Etude des propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires, anti-prolifératives et anti-migratoires des huiles essentielles de quelques plantes médicinales du Burkina Faso sur des lignées cellulaires du cancer de la prostate et de glioblastomes ; Thèse Présentée Pour obtenir le grade deDOCTEUR D'UNIVERSITE ;Spécialité : Physiologie et génétique moléculaire. :pp27/223.

**Bakkali, F., Averbek, S., Averbek, D., Idaomar, M( 2008).** Biological effects of essential oils--a review. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.*pp. 46, 446– 475. doi:10.1016/j.fct.2007.09.106.

**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. pp994.

**Benkeblia N., (2004).** Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Alliumcepa*) and garlic (*Allium sativum*). *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.* 37 pp. 263-268.

**Bergogne-Bérézin E., Dellamonica P. ; (1999).** Antibiothérapie en pratique clinique. 2ème Ed. *Masson*. Paris. France .

**Boden, MK., Flock, JI.(1989).** Fibrinogen-binding protein/*clumping factor* from *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*. 1989; 57 (8), pp2358-2363.

**Boullard B. (2001).** Plantes médicinales du monde : croyances et réalités. Éditions Estem, Paris.

**Bruneton J., (1993).** Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales. *Tec. & Doc*. Lavoisier, 2ème édition, Paris. pp915.

**Bruneton J., (1999).** Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales. *Tec. & Doc*. Lavoisier 3ème édition, Paris.

**Bruneton J.,(2008).** Pharmacognosie- Phytochimie , plantes médicinales, 2ème édition., *Tec. & Doc*- Editions médicales internationales, p1188.

**Buettner, GR., (1993).** The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys*. Pp. 300:535-543.

**BURNICHON Nelly et TEXIER Anthony ;(2003).** L'ANTIBIOGRAMME : LA DETERMINATION DES SENSIBILITES AUX ANTIBIOTIQUES ;  
L'antibiogramme DES bactério / pp.29

**Buronzo AM., (2008).** Le Grand Guide des Huiles essentielles. Ed : HACHETTE Pratique. Pp.235.

**Burt S., (2004).** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. *Int J Food Microbiol* 2004; 94: 223-53 review. *International Journal of Food Microbiology* 94, pp.223-253.

## C

**Caillet S., Lacroix M., (2007).** Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. INRS-Institut Armand-Frappier, (*RESALA*). Pp :1- 8.

**Canillac N. and Mourey A.,( 2001).** Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. *Food Microbiol*. 18: pp. 261-268.

**Cazzola C., Doublet C.,( 2015).** Mise au point d'une technique de séparation et de quantification des composés présents dans une huile essentielle. Rapport PE huiles essentielles, projet de l'Institut National des Sciences Appliquées de Rouen (INSA).Pp .13-14

**CDC National Nosocomial Infections Surveillance System. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) system report, data summary from January 1992 to June 2004.** *Am J Infect Control.* 2004; 32, pp470-485.

**Cosentino S., Tuberoso CIG., (1999).** In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian. Thymus essential oils. *Letters in Applied Microbiology.* 29(2):pp. 130- 135

## D

**Daniel M.** Medicinal Plants: chemistry and properties; 2006.Ed: SCIENCE PUBLISHERS. Pp: 59,77.

**DEANS S. G. et RITCHIE G., (1987).** Antimicrobial properties of plant essential oils. *Intrnational Journal of Food Microbiology,* 5: pp . 162-180.

**Duquénois P, Anton R.;(1968)** [Search for derivatives of anthracene in 2 African Cassia: *Cassia nigricans* Vahl et *Cassia podocarpa* Guill. et Perr]. *Ann Pharm Fr* ; 26: pp.607-14.

**Dworkin,M., Falkow,S., Rosenberg,E., Schkeufer, KH., Stackebrandt,E.** The Prokaryotes: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria. 3eme éd. ;Springer, New-York, 2006.Vol 4, Chap.1.2.1. The genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*, pp.4-75.

## E

**Edmiston Jr.CE., Seabrook, GR., Cambria, RA., Brown, KR., Lewis, BD., Sommers, JR., Krepel, CJ., Wilson, PJ., Sinski, S., Towne, JB.;(2005)** Molecular epidemiology of microbial contamination in the operating room environment: Is there a risk for infection *Surgery.* 138 (4), pp.573-582.

**Ela M.A., El-Shaer N.S. et Ghanem N.B. (1996)** Antimicrobial evaluation and chromatographic analysis of some essential and fixed oils. *Pharmazie; 51 pp.993-995.*

**ESSAWI T., SROUR M., (2000)** Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *J Ethnopharm.* 70: 343-349 *of food safety.* 9(2): pp.97-118.

**European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infection Disease (ESCMID). (2017).** Dermination of minimum inhibitory concentration (MICs) of antibacterial agents by agar dilution. *Clin Microbiol Infect.* 6, pp.509-15.

## F

**Favier A., (2006).** Stress oxydant et pathologies humaines. *Ann. Pharm. Fr.* 64: 390-396.

**flavus and Fusarium solani.** *Veterinary Research Forum.* 2; pp. 99-105.

## G

**Gernot Katzer's Spice Pages - janvier (2005).**

URL: [http://www.uni-graz.at/~katzer/germ/generic\\_frame.html?Alpi\\_gal.html](http://www.uni-graz.at/~katzer/germ/generic_frame.html?Alpi_gal.html)

## H

**Haddouchi F., Lazouni H., Ahammer KA., Carson CF., Riley TV., (1999).**

Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol.*

86.pp.:985-990

**HANBURY D.(1871)** Historical notes on the Radix galngae ofpharmacy.

Americanjournal ofpharmacy.

<http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html> , consulté en **mai 2013**. List of

Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. J.P. Euzéby: List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature – Genus, *Staphylococcus* [en ligne].

**Hurtel JM., (2006).** Huiles essentielles et Médecine. Aromathérapie et santé.

Consulter le 02/09/2014 sur: [www.phytomania.com](http://www.phytomania.com)

**Hüsni can ba er K., Buchbauer G., (2010).** Handbook of Essential Oils: Science, Technology and Application. Ed: CRC PRESS, TAYLOR & FRANCIS., pp.: 121.

**Indian J. Pharm. Sci.,( 2010), 72 (1):** pp.145-148.

## J

**Jousselin, E.** La médecine du sport sur le terrain. 1er éd. ; Masson, Paris, (2005) ; pp224.

**JUDD, CAMPBELL, KELLOGG, STEVENS ;(2002).** Botanique systématique, une perspective phylogénétique, De Boeck Université, Paris.

## K

**Kalembe D., Kunicka A.,( 2003).** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* 10 : pp. 813-829

**Kawabata, S., Morita, T., Iwanaga, S., Igarashi, H(1985).** Staphylocoagulage-binding region in human prothrombin. *J Biochem.* 1985; 97(1), pp.325-331.

**Kloos, WE., Zimmerman, RJ., Smith, RF. Preliminary;(1976),** studies on the characterization and distribution of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species on animal skin. *Appl Environ Microbiol.* 1976; 31, pp53-49

## L

**Lardry JM., Haberkorn V., (2007).** Les Huiles Essentielles : principes d'utilisation. *Kinesitherapy Reviews.* 61: pp.18-23.

**L'Harmattan. (2005).** Les plantes aromatiques et les huiles essentielles à grasse Botanique-culture-chimie. Préface : d'Hubert Richard.

## M

- Madhavi DL., Deshpande SS., Salunkhe DK., (1996).** Food Antioxidants. Technological, Toxicological, and Health Perspectives. Marcel Dekker, Inc. New York. pp: 65.
- MARIE ELISABETH LUCCHESI (2005)** : Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles : pp. 17 ; 23,52.
- Medstudenti. Mikrobiologija** [en ligne], <http://medstudenti.webs.com/mikrobiologija.htm>, consulté en novembre (2012).
- Mohammedi Z.,( 2006).** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et des flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. *Thèse magistère*, Université Abou Bakr Belkaïd Tlemcen, pp155.
- Muanda FN., (2010).** Identification de Polyphenols, Evaluation de leur Activité Antioxydante et Etude de leurs Propriétés Biologiques. Thèse de Doctorat. Université Paul Verlaine-Metz. pp.239
- Multon JL., Richard-Molard D., and Roquebert MF., (1998).** Moisissures des alimentpeu hydrates. Lavoisier Tec&Doc, France.

## N

- NCCLS. (1999).** Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents. Approved guideline, M26-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
- Nguyen, MH., Kauffman, CA., Goodman, RP.** Nasal carriage and infection with *Staphylococcus aureus* in HIV-infected patient. *Ann Intern Med.* 1999; 130, pp221-225.

## O

- OUIBRAHIM Amira.,2015.** Evaluation de l'effet antimicrobien et antioxydant de trois plantes aromatiques (*Laurus nobilis* L., *Ocimum basilicum* L. et *Rosmarinus officinalis* L.) de l'Est Algérien. pp64/117.
- Ownagh A., Hasani A., Mardani K. and Ebrahimzadeh S., (2010).** Antifungal effects of thyme, agastache and satureja essential oils on *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus*

## P

**Padrini, F., Lucheroni M. T. (1996).** Le grand livre des huiles essentielles – guide pratique pour retrouver vitalité, bien-être et beauté avec les essences et L'aromassage Energetiques avec Plus de 100 Photographies. Edition De Vecchi, Paris. pp11, 15, 61 et 111..

**Patricia Bechaalany,(2005)** These sur : Ostéopathie et aromathérapie l'utilisation des huiles essentielles dans les affections inflammatoire en complément du traitement ostéopathique, L'european school of animal osteopathy, England, Mars2005, 12-25.

**Pauli A.,( 2001).** Antimicrobial properties of essential oil constituents. *Int. J. Aromather.* 11 :pp.126-133.

**PELT J.M. ;(1999)** Dictionnaire de la botanique, Encyclopaedia universalis: Albin Michel, Paris, 1999

**Peskin AV., Winterbourn CC., (2000).** A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1). *Clinica Chimica Acta.* pp.293 :157–166

**Pichersky, E., Noel, J.P., Dudareva, N., (2006).** Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science*311pp 808.811.doi:10.1126/science.1118510.

**PONCE A. G., FRITZ R., DEL VALLE C. et ROURA S.I., (2003).** Antimicrobial activity of oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Society of Food Science and Technology (Elsevier).*36: pp.679-684

**PONCE A. G., FRITZ R., DEL VALLE C. et ROURA S.I., (2003).** Antimicrobial activity of oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Society of Food Science and Technology (Elsevier).*36: pp.679-684.

**Pourmortazavi SM., Hajimirsadeghi SS., (2007).** Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *J. Chromatogr. A.* 1163: pp2-24.

Preface de hubert Richard, Les plantes aromatiques et les huiles essentielles a grasse, l'harmattan paris, (2005),pp209-211.

## R

**Randrianarivelo R., (2010).** Etude de l'activité antimicrobienne d'une plante endémique de Madagascar « cinnamosma fragrans », alternative aux antibiotiques en crevetticulture. Thèse de doctorat. Université d'Antananarivo. pp :45.

**Richard F., (1992).** Manuel des corps gras, Paris, Ed: Lavoisier, Tec.&Doc. pp :1228-1242.

Ruberto, G., Baratta, M.T., 2000. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chem.* 69, 167–174doi:10.1016/S0308-8146(99)00247-2.

**Rubiolo P., Sgorbini B., Liberto E., Cordero C., Bicchi ., (2010).** C. Essential oils and volatiles: sample preparation and analysis. *Flavour Fragr. J.* 25,pp. 282-290

### S

**Sharma A., Gupta S., Sarethy IP., Dang S., Gabrani R.,( 2012).** Green tea extract: Possible mechanism and antibacterial activity on skin pathogens. *Food. chem.* 135: pp.672–675

**Singh SB., Barrett JF., (2006).** Empirical antibacterial drug discovery- foundation in natural products. *Biochem. Pharmacol.* 71: 1006-1015

**Smallfield B., (2003).** Introduction to growing herbs for essential oils, medicinal and culinary purposes. *Crop. Food. Res.*pp. 45-49.

**Smith, AJ., Jackson, MS., Bagg, J.:(2001)** The ecology of staphylococcus species in the oral cavity. *J Med Microbiol.*; 50, pp940-946

**Svobda KP., Hampson JB., (1999).** Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK., KA5 6HW.

### T

**Taha ahmed benabou.,(2012).**Antibiorésistance des bactéries lactiquesisolées de produits artisanaux algériens ,mémoire por lobtenir du diplomedemagister en biotechnologie ;pp.56/121.

### V

**Vârban DI., Duda M., Vârban R., Muntean S., (2009).** Research Concerning the Organic Technology for *Satureja Hortensis* L. Culture. *Bulletin UASVM Agriculture.* 66(2), pp.225-229.

**Vásquez-J L, Ramírez N. F, Akineden Ö et Fernández-S. J.A. (2017).** Presence of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae in bulk-tank milk of bovine dairy farms in Antioquia, Colombia. *Rev Colomb Cienc Pecu.* 30,pp. 85-100.

**Vincent MC., (1991).** L'aromatogramme. Encyclopédie de médecine naturelle, phytothérapie, aromathérapie, Paris.

**Voukou D., Kokkini S. & Bressiere J.M., (1988).** Origanum onites ( Lamiaceae) in Greece Distribution , volatile oil yield, and composition . *Economy botanic*. pp.42:407-412.

### W

**Waston, K., Carville, K., Bowman, J., Jacoby, P., Riley, TV., Leach, AJ., Lehmann, D.:(2006)** Upper Respiratory Tract Bacterial Carriage in Aboriginal and Non-Aboriginal Children in a Semi-Arid Area of Western Australia. *Pediatr infec Dis J*. 2006; 25, pp782-790.

**Wenqian Yuan, Hyun-Gyun Yuk.(2017)** Antimicrobial efficacy of Syzygium antisepticum plant extract against Staphylococcus aureus and methicillin-resistant S. aureus and its application potential with cooked chicken., pp.176-184

**WICHTL M., ANTON R. ;(2003)** Plantes thérapeutiques. Tradition, pratique officinale, science et thérapeutique, Tech & doc, Paris.

**Williams, RE.:(1963)** Healthy carriage of Staphylococcus aureus: its prevalence and importance. *Bacteriol Rev.*; 27, pp56-71.

### Y

**Yen TB., Chang ST., (2008).** Synergistic effects of cinnamaldehyde in combination with eugenol against wood decay fungi. *Bioresource of Technology*. 99: pp.232-236.

**Yu, VL., Goetz, A., Wagener, M.:(1986)** *Staphylococcus aureus* nasal carriage and infection in patients on hemodialysis: efficacy of antibiotic prophylaxis. *N Eng J Med*.1986; 315, pp.91-96.

### Z

**ZAIKA L., (1988).** Spices and Herbs : Their Antimicrobial Activité and Its Determination. *Journal of Food Saftey*, 9(2):pp. 97-118.

**Zaika LL.,( 1988).** Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination. *Journal*. ZHENGI W., RAVEN P.H. Flora of China, Science press & Missouri botanical garden, 1995.

**Zhiri A., Baudoux D., (2005).** Huiles essentielles chémotypées et leurs synergies. Edition Inspir Development. Luxembourg. pp .8.

**Annexe : Milieux de culture.**

<b>Milieu de culture</b>	<b>Constituant</b>	<b>Quantité</b>
<b>Bouillon nutritif</b>	Extrait de viande	05g
	Peptone	10g
	Chlorure de sodium	05g
<b>Muller Hinton</b>	Extrait de viandes	03g
	Hydrolisation acide de caseine	17,5g
	Agar	16g
<b>Gélose nutritive</b>	Extrait de viande	05g
	Peptone	10g
	Chlorure de sodium	05g
	Agar	15g