

REPUBLIQUE ALGERENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة عمار ثلجي
UNIVERSITE AMMAR THELIDJI
كلية العلوم
FACULTE DE SCIENCES
قسم البيولوجيا
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Science biologiques

Option : Microbiologie Appliquée

THEME

**Activité antibactérienne des huiles essentielles d' El-
aray'ira (*Achillea santolina* L).**

Présenté par : HAMDY Khaoula et RENNANE Assia

Devant le jury :

Président :	Mr. GUENANE Hamid	MCB
Rapporteur :	Mr BERRAMDENE Tayeb	MAA
Co-Rapporteur :	Mr. BOUBRIMA Youcef	MAA
Examinatrice :	M ^{me} . KRAZA Lamia	MAA

Soutenu publiquement le : 20 Juin 2018

Dédicace

Aux êtres les plus chers : Mes parents ;

A mon cher frère: Mahfoud ;

A mes sœurs: Nassira, Fatima, et Fieneb ;

A ma petite nièce: Iness ;

A mes amis: Souatef, Aicha, et Mimi,

*A tous qui ont une place importante dans
ma vie ; je vous aime.*

Khaoula

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A mes chers parents, qui m'ont soutenue durant tout mon cursus, car c'est à leur inépuisable bonté que je dois tout.

L'éducation que j'ai reçue de mon vénérable père, ses précieux conseils ainsi que ceux de ma chère et adorable mère.

A toute ma famille.

A tous ceux que j'aime.

Assia

Remerciements

Nous remercions Dieu, le tout puissant, qui nous a donné la force, la patience ainsi que le courage pour arriver à réaliser ce travail.

Nous tenons par la suite à exprimer toute notre gratitude et nos sincères remerciements à notre encadreur Mr. Berramdane, T. pour avoir dirigé ce travail ainsi que pour ses précieux conseils et ses critiques constructives.

Nous remercions particulièrement Mr. Boubrima, Y. pour son aide comme un Co-encadreur.

Nous adressons nos chaleureux remerciements aux respectueux membres du jury d'avoir accepté présider et examiner notre travail.

Nos vifs remerciements vont également au personnel du :

- ✓ *laboratoire central de l'EPH de Laghouat, Le chef du service Mr. Bourahla, les collègues Saida et Khadidja pour leur aide, leur encouragement et leur disponibilité.*
- ✓ *laboratoire de recherche des sciences fondamentales LRSF université Amar Telidji Laghouat.*

Nous remercions Fatim, A. et tout le personnel travaillant au laboratoire du département de biologie. Finalement, nous tenons à remercier toute personne qui à participer à l'aboutissement de ce projet de près ou de loin.

Liste des tableaux.....	I
Liste des figures.....	II
Liste des abréviations.....	IV
Introduction.....	01

Partie bibliographique

Chapitre I. Généralités sur l'espèce étudiée.....	03
I-1. La Famille des Astéracées (Composées).....	03
I-1.1. Généralités.....	03
I-1.2. Caractéristiques générales.....	03
I-1.3. Les sous-familles des astéracées.....	03
I-1.4. Espèce <i>Achillea santolina</i> L.....	03
a- Description du genre.....	03
b- Caractéristiques du genre.....	04
c- Principales espèces.....	04
d- Distribution et aire géographique.....	05
e- Caractère phytochimique du genre <i>Achillea</i>	05
f- Importance économique et thérapeutique du genre <i>Achillea</i>	05
g- Intérêt biologique du genre <i>Achillea</i>	06
Chapitre II. Généralités sur les huiles essentielles et les phénols.....	07
II-1. Généralité sur les huiles essentielles.....	07
II-1.1. Définition.....	07
II-1.2. Répartition et localisation.....	07
II-1.3. Propriétés physico-chimique.....	08
II-1.3.1. Propriétés physique.....	08
II-1.3.2. Composition chimique.....	08
II-1.4. Effet biologique des huiles	09
II-1.5. Intérêt thérapeutique.....	09
II-2. Généralité sur les phénols.....	11
II-2.1. Définition.....	11
II-2.2. Répartition et localisation.....	11
II-2.3. Composition chimique.....	11
II-2.4. Effets biologiques	12
II-2.5. Intérêts thérapeutiques des polyphénols.....	13
II-3. Phytothérapie.....	14
II-3.1. Aromatogramme.....	14
II-3.2. Activité bactéricide et bactériostatique.....	14
Chapitre III. Généralité sur les souches microbiennes étudiées.....	16
III-1. Le genre <i>Escherichia</i>	16
III-2. Le genre <i>Pseudomonas</i>	16
III-3. Le genre <i>Staphylococcus</i>	16
III-4. Le genre <i>Bacillus</i>	17
III-5. Le genre <i>Micrococcus</i>	17

Partie expérimentale

Chapitre IV. Matériel et méthodes.....	19
IV-1. Matériel.....	19
IV-1.1 Matériel végétal.....	19

IV-1.1.1. Lieu et période de récolte.....	19
IV-1.2. Souches microbienne.....	20
IV-1.3. Les antibiotiques utilisés.....	21
IV-2. Méthodes.....	22
IV-2.1. Séchage et conservation	22
IV-2.2. L'huile essentielle	22
IV-2.2.1. Extraction de l'HE	22
IV-2.2.2. Calcul du rendement	23
IV-2.2.3. Analyse chromatographique de l'HE.....	23
IV-2.3. Extraction des composés phénoliques.....	24
IV-2.3.1. Calcul du rendement	24
IV-2.5. Activité antimicrobienne des HEs.....	25
IV-2.5.1. Tests de confirmation de la pureté des souches.....	25
IV-2.5.2. Préparation de l'inoculum.....	25
IV-2.5.3. Test de sensibilité aux antibiotiques.....	26
IV-2.5.4. L'aromatogramme	26
IV-2.5.5. Détermination de la CMI par la méthode de dilution.....	26
IV-2.5.6. Détermination de la CMB en milieu solide.....	27
IV-2.6. Activité antibactérienne des extraits phénoliques.....	28
Chapitre V. Résultats et discussions.....	29
V-1. Les HEs	29
V-1.1. Extraction	29
V-1.1.1. Cinétique	29
V-1.1.2. Rendement des HEs.....	30
V-1.2. Analyse chimique des HEs.....	31
V-1.3. L'activité antibactérienne.....	32
V-1.3.1. Tests de confirmation de la pureté des souches.....	32
V-1.3.2. L'antibiogramme	33
V-1.3.3. L'aromatogramme.....	34
V-1.3.4. CMI et CMB	37
V-2. Les composés polyphénoliques.....	39
V-2.1. Extraction et rendement.....	39
V-2.2. Activité antibactérienne des extraits phénoliques bruts.....	40
V-3. Discussions générale.....	40
Conclusion.....	43
Références bibliographiques	i
Annexes	viii

N°	Titre du tableau	Page
01	Définition des grandeurs CMI et CMB	15
02	Origine des souches utilisées dans les différents tests de l'activité Antibactérienne	21
03	Antibiotiques utilisés et leur charge sur le disque	21
04	Composition chimique des huiles essentielles d' <i>A. santolina</i>	31
05	Résultats des tests de confirmation.	32
06	Résultats de l'antibiogramme	33
07	Halos d'inhibition en mm provoqués par les cinq H.E. testées.	34
08	Détermination de la CMI et de la CMB des huiles essentielles d' <i>A.santolina</i> sur les différentes souches étudiées.	38
09	Détermination des CMI et CMB de la Gentamycine vis-à-vis les souches étudiées	39

N°	Titre	Page
01	Photo représentant la plante <i>Achillea santolina L</i>	04
02	Effets majeurs de quelques huiles essentielles	10
03	Les principales fonctions des polyphénols.	13
04	La plante <i>Achillea santolina</i> .	19
05	Carte géographique de sites de récolte de la plante	20
06	Le montage d'extraction des huiles essentielles (Clevenger).	22
07	Appareil de sonication.	24
08	Principe de la méthode de diffusion par disque.	26
09	Méthode de détermination de la CMI en milieu liquide.	27
10	Détermination de la CMB en milieu solide.	28
11	Les huiles essentielles dans l'appareil.	29
12	Cinétique d'un extrait huileux par rapport le temps d'extraction.	30
13	Rendement en huile essentielle des cinq échantillons.	30
14	Résultat du système d'identification Api 20 E.	33
15	Représentation graphique des diamètres d'inhibition des bactéries à Gram positif vis-à-vis de différents huiles essentielles et antibiotiques (Gn : Gentamycine, E : Érythromycine, DA : Clindamycine	36

16	Représentation graphique des diamètres d'inhibition des bactéries à Gram négatif vis-à-vis de différents antibiotiques et huiles essentielles NA : Acide nalidexique, CL : Colistine, OFX : Ofloxacine, ATM : Aztreonam, AK : Amikacine	37
17	Les extraits phénoliques bruts.	39
18	Rendement en polyphénols des cinq échantillons.	40

ATCC	American Type Collection Culture.
CFU	Colony Forming Units.
CMB	Concentration Minimale Bactéricide.
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice.
CPG	Chromatographique en Phase Gazeuse.
DMSO	Diméthylsulfoxyde.
DO	Densité Optique.
Galerie API 20 E	Analytical Profile Index 20 microtubes Entérobactéries.
HE	Huile Essentielle.
MF	Mac Ferland (0.5MF=10⁸UFC).
MH	Mueller-Hinton.
MHB	Mueller-Hinton Bouillon.

Introduction

En Algérie comme dans les autres pays en voie de développement, les maladies infectieuses et parasitaires constituent un problème de santé publique à cause de leur fréquence et de leur gravité. La situation est plus préoccupante à cause de l'apparition des souches de micro-organismes antibiorésistants et l'émergence des infections non communes qui compromettent les traitements à l'aide des médicaments existants. Face à ces nombreux obstacles que présente l'utilisation des antibactériens disponibles, il est indispensable de rechercher de nouvelles substances antibactériennes efficaces et à large spectre d'action. Une des stratégies pour cette recherche consiste à explorer les plantes utilisées en médecine traditionnelle **(Basli, et al.,2012)**

Les plantes médicinales et aromatiques ont été toujours considérées comme une source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques pour le traitement de toutes les maladies de l'homme qui est en réalité très ancienne et évolue avec l'histoire de l'humanité **(Farnsworth et al., 1986)**.

Actuellement, l'utilisation thérapeutique des extraordinaires vertus des plantes ont acquis une grande popularité et un intérêt scientifique.

En effet, le développement des techniques d'analyses chimiques a permis de révéler qu'une espèce végétale peut synthétiser des milliers de constituants chimiques différents conduisant à une grande biodiversité moléculaire, à titre d'exemples les HEs et les phénols **(Wichtel et Anton., 1999 ; Ramawat et Mérillon 2008)**.

Les phénols et les HEs ont plusieurs applications industrielles, comme dans la production des cosmétiques, dans l'industrie alimentaire en tant qu'additifs (en tant que colorants et conservateurs naturels) et dans la production pharmaceutique. Leur utilisation est liée à leurs larges spectres d'activités biologiques reconnues en tant qu'agents antimicrobiens à large spectre, antidiarrhétiques, antiulcéreux et anti-inflammatoires, antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne, ainsi que dans le traitement de quelques maladies **(Cowan, 1999; McCurdy and Scully, 2005 ; Ramawat et Mérillon 2008; Nuzhat et Vidyasagarg., 2013)**

L'Algérie possède une flore végétale riche et diversifiée en plantes médicinales dont beaucoup d'études ont pu mettre en reliefs l'intérêt de leurs utilités traditionnelles **(Bouzabata 2013 ; Bouallal et al., 2014)**, et la valorisation de leur substances bio-actives **(Djeridane et al., 2007 ; Hammoudi et al., 2012 ; Hadji, 2013)**.

C'est dans cette optique que nous nous sommes intéressés à l'étude d'une plante steppique *Achillea santolina* qu'est utilisée par les habitants de la région dans plusieurs indications, d'après les herboristes.

Notre travail a porté sur l'effet antibactérien des huiles essentielles et les extraits phénoliques extraits de cette espèce vis-à-vis de quelques souches. Il a été effectué au département de Biologie en coordination avec le Laboratoire de Recherche des Sciences Fondamentales (LRSF), au niveau de notre université, connu par ses travaux dans le domaine de produits naturels et le service de microbiologie de l'Etablissement Public Hospitalier (EPH) Ahmida Benadjila-Laghouat.

Notre mémoire se divise en deux parties: une première partie théorique ou synthèse bibliographique qui regroupe des données sur la plante étudiée et son intérêt, et des généralités sur les huiles essentielles, les phénols et leurs propriétés pharmacologiques. La partie donne aussi un aperçu sur les différentes souches mises en évidence.

La deuxième partie expérimentale composée de chapitre matériel et méthodes dont lequel nous présentons le protocole d'extraction des extraits bruts et les méthodes de l'évaluation de l'activité anti-bactérienne, suivi du chapitre résultats et discussion. Le mémoire se termine par une conclusion.

Synthèse bibliographique

I-1. La Famille des Astéracées (Composées)

I-1.1. Généralités

La famille des Astéracées ou composées est une famille plus importante dans le règne végétal, elle comprend près de 13000 espèces réparties en 1500 genres. Ce sont essentiellement des plantes herbacées même s'il existe des arbres, des arbustes ou des lianes dans cette famille. Son nom scientifique: Astéracée a été introduit par Martynov en 1820 et le nom composé revient à Giseke dès 1792 (**Boudjerda, 2008**).

I-1.2. Caractéristiques des Astéracées

Les astéracées ont la caractéristique commune d'avoir des fleurs réunies en capitules, c'est-à-dire serrées les unes à côté des autres, sans pédoncules, placées sur l'extrémité d'un rameau ou d'une tige et entourées d'une structure formée par des bractées florales. Cette structure en forme de coupe ou de collecte est appelé involucre. Les fleurs des astéracées, appelées aussi fleurons, se présentent sous deux formes: « Des languettes, ou ligules », et des tubes terminés par des lèvres, imperceptibles ou s'ouvrant plus ou moins largement en cinq lobes (**Ozenda, 1958**).

I-1.3. Les sous-familles des astéracées

Les composées sont divisés en trois sous-familles: les tubuliflores, les radiées et les liguliflores. Les premières ont une inflorescence uniquement composée de fleurs tubuleuses régulières, les secondes ont des fleurs tubuleuses régulières au centre (c'est ce qu'on appelle le disque) et des fleurs tubuleuses irrégulières ou ligulées tout autour en forme de couronne (c'est le rayon). Le calice de chaque fleur est très réduit mais peut également être absent ou transformé en une touffe de poils, qui demeure autour de la graine et en facilite la dissémination (**Ozenda,1958**).

I-1.4. Espèce *Achillea santolina* L

a- Description du genre

Le genre *Achillea* regroupe diverses plante de la famille des astéracées (ou composées) dont la plus connue est l'achillée mille feuilles (*Achillea millefolium*).

Le nom du genre correspond au latin *Achillea*, lui-même emprunté au grec Akhileos, herbe d'Achille. L'achillée est une plante médicinale dont les vertus lui ont valu son nom (Quézel et Santa., 1962).

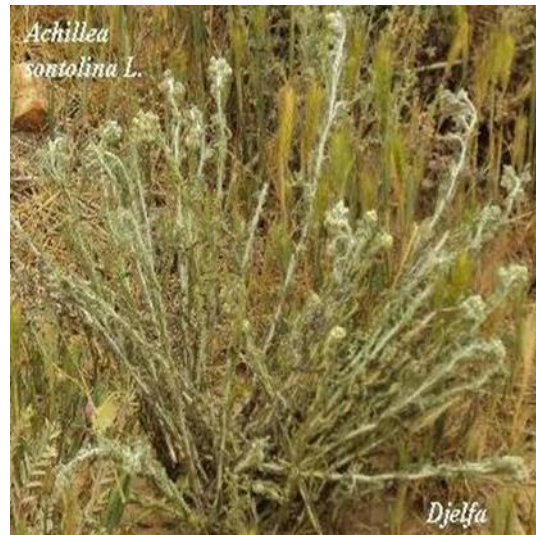


Figure 01 : Photo représentant la plante *Achillea santolina L.* (www.djelfa.info)

b- Caractéristiques du genre

Plantes herbacées vivaces à fleurs alternes, comme pour toutes les composées, ce qu'on appelle communément « fleur » est un capitule. Les capitules des achillées sont formés d'un disque de fleurs tubulées hermaphrodites entourées de fleurs ligulées femelles (Ozenda, 1958). Les ligules, presque toujours blanches, sont assez courtes, le plus souvent à trois dents. Très nombreux sur la plante, les capitules sont groupés en inflorescences appelées Carymbes. Les fruits sont des akènes.

c- Principales espèces (Quézel et Santa., 1963)

D'après Quézel et Santa (1963) on distingue six espèces, à savoir :

-*Achillea santolina L.*, *Achillea ageratum L.*, *Achillea atrata L.*, *Achillea odorata L.*
Achillea nobilis L. et *Achillea millefolium L.*

d- Distribution et aire géographique

Le genre *Achillea* (Fam. *Asteraceae*) est représenté par environ 115 espèces dans les régions tempérées du Nord hémisphère, principalement en Afrique du Nord, en Europe du Sud-Est, et Asie du Sud-Ouest (**Boulos, 2002**).

Le genre *Achillea* se trouve dans les lieux suivants: sauvage, zone découverte, prairies, forêts claires, décombres, talus, berges, bord des fossés et jardins, et jusqu'à une altitude de 2500 m.

e- Caractère phytochimique du genre *Achillea*

D'après la littérature, les espèces du genre *Achillea* contiennent des huiles essentielles (des terpénoïdes), des flavonoïdes et les lactones sesquiterpéniques (**Boudjerda et al., 2008 ; Rahimmaleka et al., 2009 ; Boudjerda, 2013**).

f- Importance économique et thérapeutique du genre *Achillea*

L'espèce, est utilisée dans de nombreux produits de phytothérapie en Europe, notamment comme anti-inflammatoire, et aussi est utilisée contre le rhume, les crampes, la fièvre, les troubles rénaux, le mal de dent et les irritations cutanées. *Achillea* est généralement présente dans plus de 20 produits pharmaceutiques commercialisés au Canada (**Boudjerda, 2013**), et elle est très populaire dans les produits de phytothérapie commercialisés en Europe.

On la considère comme une culture oléagineuse d'importance secondaire, mais la production annuelle de cette huile est importante et peut atteindre 800 tonnes dont la valeur est estimée à 88 millions de dollars US. Plus d'une centaine de composés chimiques ont été identifiés dans le genre *Achillea* (flavonoïdes, terpènes, et lactones) (**Bader et al., 2003**).

Toutefois la valeur médicinale de cette plante pourrait être due aux chamazulène, et aux terpénoïdes tels le 1,8-Cinéole, le β -Caryophyllène, le limonène et le camphre, qui ont des effets anti-inflammatoires, antispasmodiques ou antioxydants (**Sokmen et al., 2004**).

Récemment, l'analyse des composés volatils des racines, des tiges, des feuilles et des fleurs de *A. fillipendulina*, de *A. tomentosa* et de *A. millefolium* a mené à l'identification de

plus de 125 composé. Tous les tissus de la plante, peu importe l'espèce, renferment de l' α -pinène, du β -pinène, du camphène, du limonène, du 1,8-cinéole et du p-cymène (**Shawl et al., 2002**).

g- Intérêt biologique du genre *Achillea santolina*

La recherche bibliographique menée sur l'intérêt biologique des espèces du genre *Achillea santolina* L a montré que cette espèce est utilisée en médecine traditionnelle depuis l'ancien temps, principalement comme antihémorragique (**Valant-Vetschera, 1988**), analgésique, antipyrétique (**Bruno et Herz., 1988**), antiallergique (**Shahat et al., 2002**), antitumorales mais aussi anti-cancéreuses, antioxydant (**Bruno et Herz., 1988**), vulnéraire et carminative, ainsi comme un anti-inflammatoire des maladies de la peau (**Simonpoli, 1993**).

II-1. Les huiles essentielles

II-1.1. Définition

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 HEs sont généralement des terpénoïdes responsables de l'arôme et de la saveur associés aux herbes, aux épices et aux parfums, aussi appelés huiles volatiles, car ils se diffusent facilement dans l'air. (**Nuzhat et Vidyasagar., 2013**)

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

II-1.2. Répartition et localisation

Les HEs se rencontrent dans tout le règne végétal. Cependant, elles sont particulièrement abondantes chez certaines familles telles que : les Conifères, les Rutacées, les Ombellifères, les Myrtacées, les Lamiacées, les Poacées.

Elles sont présentes dans différents organes végétaux producteurs, variant en fonction de la zone productrice du végétal : les sommités fleuries (ex: lavande, menthe...), dans les racines ou rhizomes (ex: vétiver, gingembre), dans les écorces (ex: cannelles), le bois (ex: camphrier), les fruits (ex: citron), les graines (ex: Muscade) et sont contenues dans des structures spécialisées à savoir : les poils, les canaux sécréteurs et les poches (**Lakhdar, 2015**).

II-1.3. Propriétés physico-chimiques

II-1.3.1. Propriétés physiques

Les HEs possèdent en commun un certain nombre de propriétés physiques :

- Elles sont solubles dans l'alcool, l'éther, le chloroforme, les huiles fixes, les émulsifiants et dans la plupart des solvants organique, et peu solubles dans l'eau à laquelle, toutefois, elles communiquent leur odeur.
- Leur point d'ébullition varie de 160 à 240 C.
- Leur densité en général est inférieure à celle de l'eau, elle varie de 0.75 à 0.99.
- Elles ont un indice de réfraction élevé.
- Elles sont dextrogyres ou lévogyres, rarement inactives sur la lumière polarisée.
- Elles dissolvent les graisses, l'iode, le soufre, le phosphore et réduisent certains sels.
- Ce sont des parfums, et sont de conservation limitée.
- Sont très altérables et sensibles à l'oxydation (mais ne rancissent pas).
- Ce sont des substances de consistance huileuse, plus ou moins fluides, voire rétinoides, très odorantes et volatiles.
- A température ambiante, elles sont généralement liquides, incolores ou jaunes pales, il existe, cependant, quelques exceptions, exemple : huile essentielle à azulène de coloration bleue (**Bruneton, 2008 ; Baser et Buchbauer, 2010**).

II-1.3.2. Composition chimique

Les constituants principaux des HEs - mono et sesquiterpènes, y compris les hydrates de carbone, les alcools, les éthers, aldéhydes et cétones - sont responsables de la fragrance et propriétés biologiques des plantes aromatiques et médicinales (**Kalemba et Kunicka., 2003**). Elles sont constituées de molécules à squelette carboné, le nombre d'atomes de carbone étant compris entre 5 et 22 (le plus souvent 10 ou 15) (**Lakhdar, 2015**).

Les constituants des HEs appartiennent, de façon quasi exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpénoïdes (monoterpènes ; et les sesquiterpènes) d'une part et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane, beaucoup moins fréquents, d'autre part.

Elles peuvent également renfermer divers produits issus de processus dégradatifs mettant en jeu des constituants non volatils (**Bruneton, 1999**).

II-1.4. Effets biologiques des huiles

Beaucoup de plantes produisent les HEs en tant que métabolites secondaires mais leur rôle exact dans les processus de la vie de la plante est inconnu.

Il y a beaucoup de spéculation au sujet du rôle des huiles essentielles, certainement plusieurs effets utiles ont été décrits tels que:

- la réduction de la compétition des autres espèces des plantes (Allélopathie) par l'inhibition chimique de la germination des graines.
- la protection contre la flore microbienne infectieuse par les propriétés fongicides et bactéricides et contre les herbivores par le goût et effet défavorables sur le système nerveux.
- Certains auteurs pensent que la plante utilise les HEs pour repousser ou attirer les insectes dans ce dernier cas pour favoriser la pollinisation. (**Khadri, 2009**).

II-1.5. Intérêt thérapeutique

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 antioxydantes;
- 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 (**Labioud, 2016**).

L'efficacité des huiles extraites des achillées, *Achillea fragrantissima*, *A. setacea*, *A. teretifolia* et *A. millefolium*, contre la levure pathogène *Candida albicans*, a également été mise en évidence ; D'autres HE présentent un pouvoir antioxydant ou un effet anti-inflammatoire (Guinoiseau, 2010).

L'huile végétale aurait des propriétés antibactériennes, antifongiques, antivirales, antiparasitaires (Nuzhat et Vidyasagar., 2013).

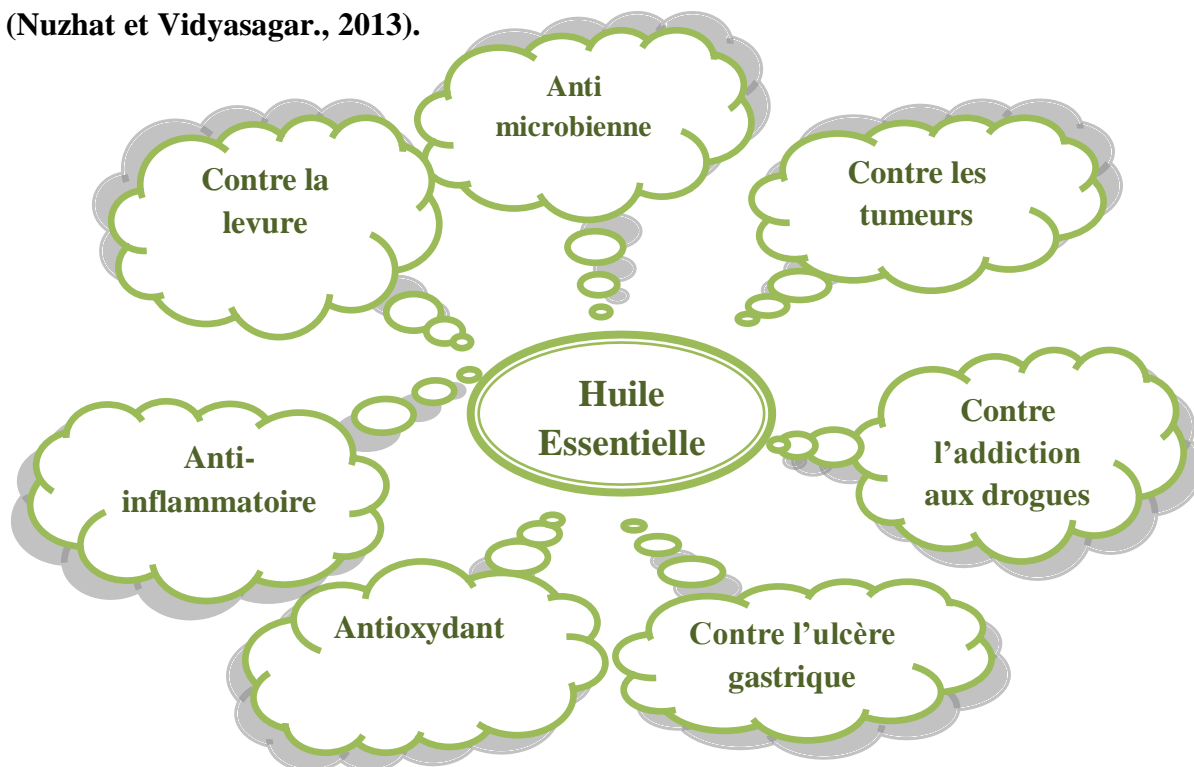


Figure 02 : Effets majeurs de quelques huiles essentielles.

II-2. Les composés phénoliques

II-2.1. Définition

Les composés phénoliques constituent une famille de molécules très largement répandues dans le règne végétal. On les trouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits. Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires, ce qui signifie qu'ils n'exercent pas de fonctions directes au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal, comme la croissance, ou la reproduction (**Havsteen, 2002**).

Ces composés ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles. La structure des composés phénoliques naturels varie depuis les molécules simples (acides phénoliques simples) vers les molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés). Avec plus de 8000 structures phénoliques identifiées (**Urquiaga et Leighton., 2000**).

Les composés phénoliques notamment les flavonoïdes et les tannins sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrases) ou d'autres interactions pour inactiver les adhésines microbiens, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire (**Cowan., 1999**)

II-2.2. Répartition et localisation

Sur le plan cellulaire, les flavonoïdes sont synthétisés dans les chloroplastes puis migrent et se dissolvent dans les vacuoles (**Piquemal, 2008**), la répartition de ces composés montre des accumulations très localisées, généralement en relation avec une fonction physiologique ou avec l'interaction de la plante avec son environnement. Ainsi, les flavonoïdes qui ont une localisation épidermique ont un rôle d'écran vis-à-vis des rayonnements solaires, tandis que ceux qui sont impliqués dans les mécanismes de défense ont plutôt une localisation sous épidermique (**Boudet, 2000**)

II-2.3. Composition chimique

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en de nombreuses classes qui se différencient d'abord par la complexité du squelette de base (allant d'un simple C6 à des

formes très polymérisées). Ensuite par le degré de modification de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation et de méthylation, etc.). Enfin par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines, etc.) (**Macheix et al., 2005**).

On distingue :

- Les acides phénoliques qui sont divisés en deux sous-classes : les acides hydroxybenzoïques et l'acides hydroxycinnamiques (**Sarni-Manchado et Cheynier.,2006**).
- Les flavonoïdes, présents dans la plupart des plantes, sont des pigments phénoliques qui contribuent entre autres, à colorer les fleurs et les fruits en jaune ou en blanc. Ce sont des substances naturelles très répandues dans la famille des *Compositae* (**Eberhard et al.,2005**).
- Les tanins sont un groupe de composés phénoliques à haut poids moléculaire. Les tanins sont des molécules fortement hydroxylés et peuvent former des complexes insolubles lorsqu'ils sont associés aux glucides, aux protéines et aux enzymes digestives, réduisant ainsi la digestibilité des aliments. Ils peuvent être liés à la cellulose et à de nombreux éléments minéraux (**Alkurd et al., 2008**).
- Les coumarines sont des hétérocycles oxygénés ayant comme structure de base le benzo-2 pyrone (**Iwueke et Nwodo, 2008**).

II-2.4. Effets biologiques

Comme la majorité des composés secondaires, les composés phénoliques sont produits par les plantes afin d'accomplir des fonctions précises, les plus notoires étant :

- Défense contre les pathogènes ; principalement les moisissures et les bactéries phytopathogènes.
- Dissuasion alimentaire. On parle du phénomène d'allélopathie : certaines plantes émettent des substances pour inhiber la croissance des autres plantes.
- Attraction des pollinisateurs : les couleurs, mais aussi les odeurs attirent les insectes. Exemple : certaines orchidées synthétisent des phéromones sexuelles qui sont des substances volatiles émises par les insectes femelles pour attirer les mâles.
- Protections contre les rayonnements UV.

- Molécules qui donnent des arômes et parfums aux plantes. Ce qui sert principalement à repousser les herbivores. Exemple : les polyphénols des pélagoniums (**Druyne, 1999 ; Schiestl et al., 2000 ; Yi-Cai et al. 2000 ; Sasaki et Takahashi., 2002 ; Macheix et al., 2005**).

II.2.5. Intérêts thérapeutiques des polyphénols

Les composés phénoliques sont largement utilisés dans les domaines thérapeutiques et pharmaceutiques. Parmi les nombreux intérêts qu'offrent les polyphénols à la santé, nous pouvons citer les intérêts suivants :

- La principale caractéristique des polyphénols est qu'ils sont des agents antioxydants très puissants ;
- Les substances phénoliques sont capables d'activer les mécanismes naturels de la défense anticancéreuse ;
- En effet, la consommation des composés phénoliques favorise la protection contre les altérations cardiaques et vasculaire ;
- Certains composés phénoliques et plus particulièrement les isoflavones du soja ont une affinité remarquable pour les récepteurs d'oestrogènes et sont qualifiés pour cela de phytoestrogènes (**Akroum, 2011**).

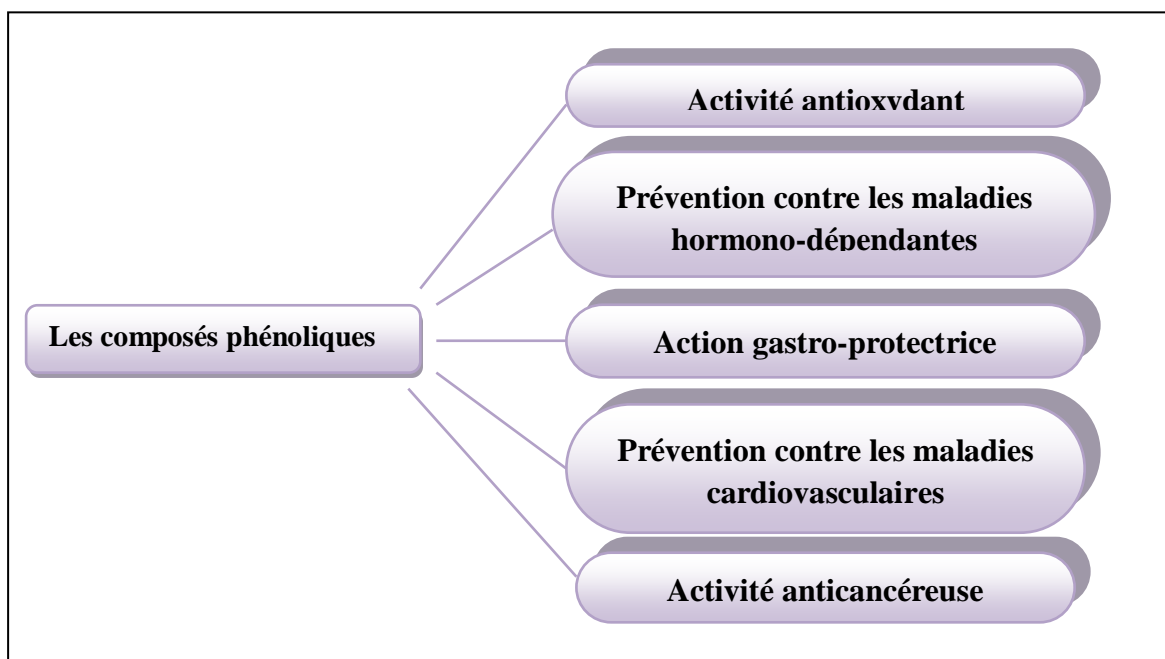


Figure 03 : Les principales fonctions des composés phénoliques (d'après **Akroum, 2011**).

II-3. Phytothérapie

Par définition la phytothérapie est le traitement ou prévention des maladies par l'usage des plantes, qui fait partie des médecines parallèles ou des médecines douces. Les principes actifs des plantes sont des composants essentiels d'une grande partie de nos médicaments et produits de soins (**Hans, 2007**). Malgré les multiples progrès de la médecine moderne, il y a un net accroissement d'intérêt vis-à-vis de la phytothérapie. Selon l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) plus de 80% de la population mondiale ont fait recours à la pharmacopée traditionnelle pour faire face aux problèmes de la santé (**Farnsworth et al., 1986**).

En effet sur les 300 000 espèces végétales recensées sur la planète plus de 200 000 espèces vivent dans les pays tropicaux d'Afrique ont des vertus médicinales (**Millogo et al., 2005**)

II-3.1. Aromatogramme

C'est une méthode de mesure, *in vitro*, du pouvoir antibactérien des HEs (**Girault et Bougeon., 1971**). Cet examen est équivalent à un antibiogramme où les antibiotiques sont remplacés par des essences préalablement sélectionnées et reconnues. Il s'agit d'une méthode en milieu gélosé à l'agar réalisée dans une boîte de Pétri. Le contact se fait par l'intermédiaire d'un disque de papier (de cellulose) de 6 mm sur lequel on dispose une quantité donnée d'huile essentielle (10 µl) (**Bondi et al, 1993**). Après ensemencement et incubation, on mesure le diamètre des zones d'inhibition.

II-3.2. Activité bactéricide et bactériostatique

L'activité antibactérienne des HEs a été la plus étudiée. On distingue deux sortes d'effets des HEs sur ces microorganismes :

- ✓ Effet bactéricide (bactéricidie) : exerçant une activité létale.
- ✓ Effet bactériostatique (bactériostase) : entraînant une inhibition de la croissance.

D'après le tableau dressé par **Bouguerra (2012)**, des définitions de chaque notion en relation avec l'activité bactéricide et bactériostatique a été retracée (tableau01).

Tableau 01: Définition des grandeurs CMI et CMB. (Bouguerra, 2012)

<i>Terme</i>	<i>Définition</i>	<i>Références</i>
CMI	Plus faible concentration d'huile essentielle inhibant toute croissance visible à l'œil nu après 16 à 20 heures d'incubation à 37°C. Les microorganismes restent cependant viables.	Hammer et <i>al.</i> (1999)*; De Billerbeck et <i>al.</i> (2002)*; Bassole et <i>al.</i> (2002)*; Oussou et <i>al.</i> (2008)*; Yang et <i>al.</i> (2009)*.
	Concentration minimale d'huile essentielle qui produit une réduction de plus de 90% de la croissance des colonies microbiennes et est déterminée par la méthode de densité optique.	Ponce et <i>al.</i> (2003)*; Phattayakorn et Wanchaitanawong (2009)*.
	Plus basse concentration requise pour l'inhibition complète des microorganismes d'essai jusqu'à 48 heures d'incubation.	Wan et <i>al.</i> (1998)*; Canillac et Mourey (2001)*.
CMB	Concentration minimale d'huile essentielle nécessaire pour détruire l'inoculum initial après incubation en conditions standards et les microorganismes ne sont plus viables.	Ponce et <i>al.</i> (2003)*; Klaric et <i>al.</i> (2006)*; Derwich et <i>al.</i> (2010)*.
	Plus basse concentration à laquelle aucune croissance n'est observée après incubation pendant 5 jours.	Mayachiew et Devahastin (2008)*.
Bactériostatique	Concentration pour laquelle les bactéries ont échoué à se développer en bouillon, mais elles peuvent se développer quand elles sontensemencées en absence de l'huile essentielle.	Smith-Palmer et <i>al.</i> (1998)*.
Bactéricide	Concentration pour laquelle les bactéries ne se développent pas en bouillon et ont échoué pour se développer quand elles sontensemencées en absence de l'huile essentielle.	Smith-Palmer et <i>al.</i> (1998)*.

*Les références des définitions rapporter *in* Bouguerra (2012)

III-1. Le genre *Escherichia*

Escherichia est un genre appartient à la famille des entérobactéries, Il est mobile capable de fermenter le lactose et de produire de l'indole (**Gueye, 2007**).

L'espèce *Escherichia coli* est une bactérie à Gram négatif, commensal du tube digestif de l'homme et de l'animal, de forme non sporulée, de type aérobie facultative, généralement mobile grâce aux flagelles, sa longueur varie de 2 à 6 µm, alors que sa largeur est de 1,1 à 1,5 µm, *E. coli* représente la bactérie la plus impliquée dans les infections aiguës d'appareil urinaire, elle provoque également les diarrhées d'été, diarrhée infantile et les intoxications alimentaires (**Percival, 2004**).

Escherichia coli exprime les caractères généraux des entérobactéries. Il est en outre : Lactose (+) ; indole (+) ; citrate (-) ; acétone (-) ; H₂S(-) (souvent) ; gaz (+) et uréase (-) (**Bakhoum, 2004**).

III-2. Le genre *Pseudomonas*

Bactéries très répandues dans la nature, caractérisées par leur résistance aux antibiotiques et aux antiseptiques. Sont des bacilles à Gram négatif, mobiles par une ciliature polaire, rarement immobiles, non sporulés. Presque toujours oxydase (+) c'est-à-dire possédant pour la plupart une chaîne cytochromique complète comprenant le cytochrome C et un cytochrome C oxydase. Caractérisés par la pluralité des substrats hydrocarbonés utilisés comme source de carbone et d'énergie (**Avril et al., 1992**).

L'espèce principale, *Pseudomonas aeruginosa* (ou bacille pyocyanique), a les caractères suivants : protéolytique, production de la pyocyanine (pigment bleu).

Pseudomonas aeruginosa exprime son potentiel pathogène lorsqu'il est introduit dans des zones aux défenses immunitaires diminuées (opportuniste majeur) (**Dantas et al., 2014**).

III-3. Le genre *Staphylococcus*

Les bactéries du genre *Staphylococcus* sont des coques (cocci) à Gram positif, groupés en amas ayant la forme de grappes de raisin, immobiles, non sporulés, catalase positive et oxydase négative.

Staphylococcus aureus réagit positivement à la coagulase. C'est une bactérie aérobie ou facultativement anaérobie qui produit des entérotoxines (**Le Loir et Gautier, 2010**).

III-4. Le genre *Bacillus*

Le genre *Bacillus* comprend des bactéries en forme de bâtonnets, généralement mobiles, sporogènes. Ces bacilles sont à Gram positif, aérobies stricts ou anaérobies facultatifs (**Hart et Shears, 1997**).

Beaucoup ne sont pas pathogènes, mais *B. anthracis* est l'agent de la maladie du charbon. *B. cereus* est à l'origine d'intoxications alimentaires (**Hart et Shears, 1997**).

- ✓ *Bacillus cereus* appartient au Groupe 01 du genre *Bacillus*. Aéro-anaérobie facultatif, mobile (\pm), nitrate (+), catalase (+), mannitol (-). Il cultive entre 10 et 45°C avec un optimum à 30-35°C. Ce germe est largement répandu dans la nature, dans l'air et le sol, il peut contaminer les aliments par ses spores (**Avril et al., 1992**).
- ✓ *Bacillus subtilis*, appartient au Groupe 02. ubiquitaire à catalase positive, aérobie pouvant se développer en anaérobiose, mobile par des flagelles peritriches, formant des spores très résistantes dont l'élimination efficace nécessite des conditions particulières. Malgré le fait qu'il s'agisse d'une bactérie à faible potentiel pathogène, elle peut donner lieu à de redoutables infections dans certains cas ou encore être à l'origine d'une intoxication alimentaire d'où l'importance de l'application des recommandations en matière d'hygiène et stérilisation afin d'éviter ces risques (**Bouhairi, 2017**).

III-5. Le genre *Micrococcus*

Les espèces du genre *Micrococcus* sont des coques Gram positif, oxydase-positifs et aérobies stricts de la famille des *Micrococcaceae*. Elles se retrouvent habituellement en grappes irrégulières, en tétrades ou en paires, où les cellules individuelles mesurent de 1 à 1,8 μm de diamètre et sont habituellement non mobiles et non sporulées (**Baird-Parker, 1962**).

M. luteus est une bactérie du sol, des poussières, de l'eau et de l'air et fait partie de la flore naturelle de la peau des mammifères. La bactérie peut aussi coloniser la bouche, de l'oropharynx et des voies respiratoires supérieures humaines (**Baird-Parker, 1962**).

Micrococcus luteus est coagulase négative, sensible à la bacitracine, et forme des colonies jaunes brillantes sur un milieu gélosé (**Breed, 1957**).

Bien que *M. luteus* n'est pas pathogène et est considéré comme un contaminant naturel, cette bactérie pourrait être un pathogène émergent engendrant des maladies nosocomiales chez des patients immunodéprimés (**Baird-Parker, 1962**).

Matériel et méthodes

IV-1. Matériel

IV-1.1 Matériel végétal

La plante qui a fait objet de notre étude est *A. santolina* (fig. 04).



Figure 04 : la plante *A. santolina* (Photo originale 2018).

IV-1.1.1 Lieu et période de récolte

Les parties aériennes d'*A. santolina* ont été récoltées de plusieurs régions d'El-Bayadh. La récolte a été entreprise manuellement au mois suivants : Avril, Mai, Juin, Juillet et Août de l'année 2017 durant laquelle la plante était en pleine floraison.

Après récolte, le matériel végétal est étalé puis laissé sécher à température ambiante ($26 \pm 2^\circ\text{C}$) dans un endroit sec et aéré, à l'abri de la lumière, pendant dix jours jusqu'à quinze jours. Après le séchage, les plantes sont récupérées dans des sacs en papier propres pour servir ultérieurement à l'extraction.

La Wilaya d'El Bayadh faisant partie intégrante de la région des hautes plaines steppiques du Sud-Ouest Algérien est située à 1313m d'altitude, $33^\circ 40' 49''$ Nord et $1^\circ 1' 13''$ Est. (Side Larbi et al.,2016)

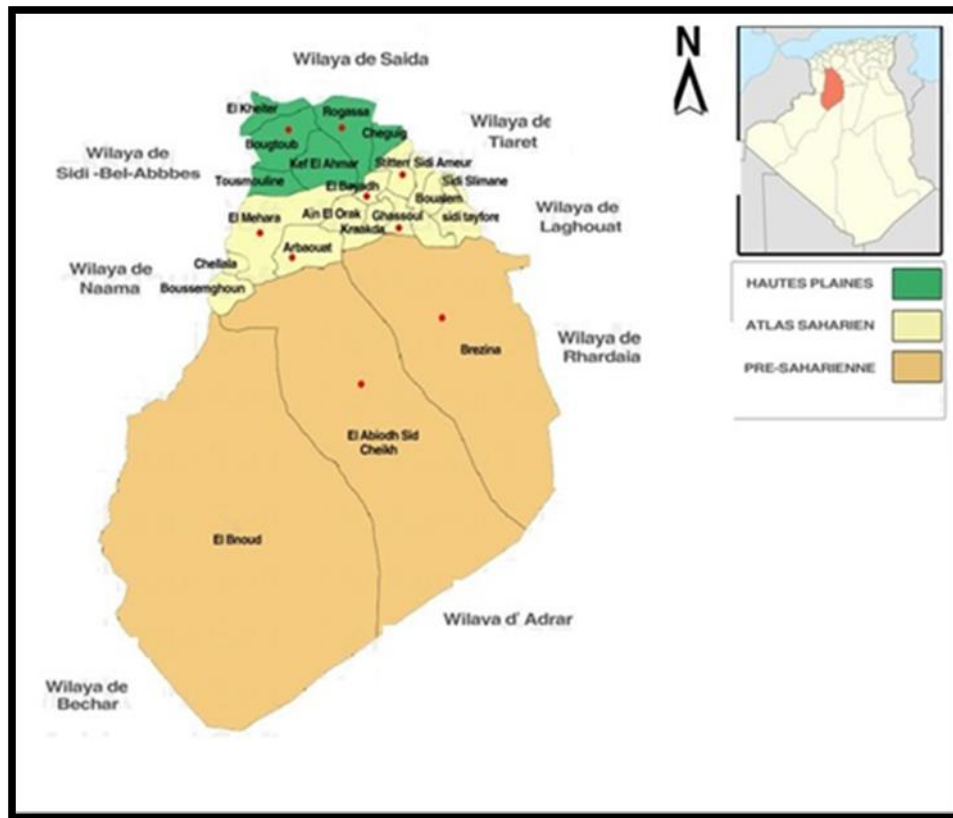


Figure 05: Carte géographique de sites de récolte de la plante (www.djelifa.info)

IV-1.2. Souches microbiennes

Pour la mise en évidence de l'activité antimicrobienne, six (06) souches bactériennes ont été testées vis-à-vis de nos HE et polyphénols. Les souches sont conservées à 5°C dans des boîtes à pétries stériles contenant 10 ml de milieu de culture incliné (gélose nutritive). Le Tableau 02 présente l'origine des souches utilisées dans les différents tests de l'activité antibactérienne.

Tableau 02 : Origine des souches utilisées dans les différents tests de l'activité antibactérienne.

<i>Souche</i>		<i>Gram</i>	<i>Reference</i>
Bactéries	<i>Staphylococcus aureus</i>	Positif	ATCC 6538
	<i>Bacillus cereus</i>		ATCC 10876
	<i>Bacillus subtilis</i>		ATCC 25921
	<i>Micrococcus luteus</i>		ATCC 9341
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	négatif	ATCC 27853
	<i>Escherichia coli</i>		ATCC 8739

V-1.3. Les antibiotiques utilisés

Le choix des antibiotiques dépend de la sensibilité de la bactérie, Les antibiotiques utilisés dans ce test sont mentionnés dans le tableau 03 ; ils proviennent tous de deux fabricants HIMEDIA ® et Cypress Diagnostics.

Tableau 03 : Antibiotiques utilisés et leur charge sur le disque.

Antibiotique	Charge du disque
Gentamycine (Gn)	10µg
Ofloxacin (Ofx)	05µg
Aztreonam (ATM)	30µg
Acide nalidexique (NA)	30µg
Colistine (CL)	25µg
Érythromycine (E)	15µg
Clindamycine (DA)	02µg
Amikacine (AK)	30µg

IV-2. Méthodes

IV-2.1. Séchage et conservation

La plante, fraîchement récoltée, est laissée sécher à l'ombre dans un endroit sec et aéré pendant dix jours, puis broyée au mortier. Les poudres obtenues sont ensuite conservées dans des flacons en verre hermétiquement fermés jusqu'à l'utilisation ultérieure pour les différentes extractions.

IV-2.2. L'huile essentielle

IV-2.2.1. Extraction de l'HE

L'extraction des huiles essentielles a été réalisée par hydrodistillation de type Clevenger. L'appareil 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 sont placés le matériel végétal sec et l'eau distillée. On distingue, aussi, une colonne de condensation de la vapeur (réfrigérant) qui vient de l'échauffement du ballon et un collecteur qui reçoit les produits de la distillation.



Figure 06 : le montage d'extraction des huiles essentielles (Clevenger) (Photo originale 2018).

Dans un ballon, 100 g des parties aériennes de la plante (broyée) sont mises en contact avec 800 ml d'eau distillée. L'ensemble est porté à ébullition pendant 4h.

L'huile essentielle est alors entraînée par la vapeur d'eau. Elle est ensuite condensée en passant par le condensateur. Le liquide recueilli résulte en un distillat avec une couche d'huile mince à la surface qui sera par la suite séparée, après repos du liquide. L'huile essentielle obtenue est ensuite placée sur un desséchant de type sulfate de sodium anhydride (Na₂SO₄), qui sera délégué avec le rotavapeur, et ceci pour éliminer toute trace éventuelle d'eau, puis effectué la pesée afin de calculer le rendement de l'extraction par rapport à la masse du plante entier. Notre HE est gardée au réfrigérateur à 4°C et à l'obscurité jusqu'à analyse et utilisation.

IV-2.2.2. Calcul du rendement

Les rendements sont déterminés par rapport à la matière sèche. Le rendement (R) est le rapport entre le poids de l'huile extraite (P') et le poids de la plante traitée (P). Il est exprimé en pourcentage et calculé par la formule suivante : **(Harborne, 1980)**

$$R\% = (P'/P) \times 100$$

R% : Rendement de l'huile en (%)

P' : Poids de l'huile en (g)

P : Poids de la plante en (g)

IV-2.2.3. Analyse chromatographique de l'HE

La chromatographie en phase gazeuse repose sur l'équilibre de partage des analytes entre une phase stationnaire et une phase mobile gazeuse. La séparation des analytes repose sur la différence d'affinité de ces composés pour la phase mobile et pour la phase stationnaire.

Le mélange à analyser est vaporisé puis transporté à travers une colonne renfermant une substance liquide ou solide qui constitue la phase stationnaire. Le transport se fait à l'aide d'un gaz inerte, appelé « gaz vecteur », qui constitue la phase mobile. A la sortie, la molécule est fragmentée puis un détecteur mesure la quantité de débris qu'il envoie comme signal sur une table traçante. On obtient un spectre où apparaissent des pics d'intégration proportionnelle à la quantité de produit injecté. Le pic est caractérisé par son temps de rétention, porté en abscisse **(Guillaume, 2017). identification des pics**

Les analyses chromatographiques ont été effectuées à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse de type Skyray Instruments GC5400, équipé d'une colonne capillaire DB-5 (30 m x 0,32 mm) avec une épaisseur de la phase 0,1 μm . D'un détecteur FID réglé à 280 °C et alimenté par un mélange de gaz H₂/air et un injecteur split - splitless réglé à 275 °C. Le mode d'injection est split (rapport de fuite : 1/50, débit : 01 ml/min). Les échantillons sont dilués (Solvant : n-C₅, Dilution : 1 : 50), 02 μl est injecté par l'appareil.

Le gaz utilisé est l'Hydrogène avec un débit de 01 ml/min. La température de la colonne est programmée de 50 à 280 °C à raison de 3 °C/min.

IV-2.3. Extraction des composés phénoliques

La méthode d'extraction choisie est la **Sonication** : procédure impliquant l'utilisation d'ultrasons avec des fréquences allant de 20 kHz à 2000 kHz selon le protocole suivant : le matériel végétal broyé (1g) est soumis à une extraction par solvant, dans un volume de méthanol de 60 ml, pendant 40 minutes à une température de 45 C°, en utilisant l'appareil de sonication (fig. 07).



Figure 07 : appareil de sonication (Photo originale 2018).

Les phases aqueuses limpides de chaque extrait ont été ensuite récupérées, filtrées et évaporées presque à sec au moyen d'un évaporateur rotatif. Le résidu sec est récupéré dans 5 ml de DMSO puis le ballon est pesé afin de calculer le rendement de l'extraction.

IV-2.3.1. Calcul du rendement

Les rendements sont déterminés par rapport à la matière sèche. Le rendement (R) est le rapport entre le poids de l'extrait phénolique (P') et le poids de la plante traitée (P). Il est exprimé en pourcentage et calculé par la formule suivante :

$$R\% = (P'/P) \times 100$$

R% : Rendement de l'extrait phénolique en (%)

P' : Poids de l'extrait phénolique en (g)

P : Poids de la plante en (g)

IV-2.5. Activité antimicrobienne des HEs

IV-2.5.1-Tests de confirmation de la pureté des souches

Les souches bactériennes utilisées sont des souches déjà identifiées et référencées.

Nous avons tenu à vérifier leur pureté par quelques tests biochimiques (catalase, oxydase et coagulase) et culturaux. Après ensemencement des bactéries sur leurs milieux sélectifs ou ordinaires, la coloration de Gram a été réalisée après 24 heures d'incubation à 37°C, ce qui a permis l'observation de la forme des cellules bactériennes et de leur mode de regroupement.

- **Galerie biochimique API 20 E**

La galerie API 20 E comporte 20 micro-tubes contenant des substrats déshydratés. Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Les bactéries ne se cultivent que si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant. La lecture de différentes réactions est faite à l'aide du Tableau de Lecture et l'identification obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification (Manuel du fabricant Biomerieux).

IV-2.5.2. Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture pure de 18 à 24 h sur milieu d'isolement approprié, à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques ont été raclées puis déchargées dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%. Après homogénéisation de la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0,5 MF ou à une D.O. de 0,08 à 0,10 lue à 625 nm. L'utilisation d'un densitomètre est fortement souhaitable (Ammari et al., 2011).

IV-2.5.3. Test de sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme)

La technique utilisée est celle de diffusion sur milieu solide. Cette méthode de référence est décrite par **Rahal et al., (2011)** dans la standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale.

IV-2.5.4. L'aromatogramme

L'aromatogramme est une méthode inspirée de l'antibiogramme qui permet de déterminer l'activité inhibitrice des huiles essentielles par la mesure du diamètre d'inhibition autour d'un disque imprégné d'huile essentielle, comme le montre la figure 07.

Cette méthode a l'avantage d'une grande souplesse dans le choix des huiles essentielles testées, et de s'appliquer à un très grand nombre d'espèces bactériennes (**Kheyar et al., 2014**).

Une suspension bactérienne de 18 à 24 heures est préparée dans l'eau physiologique stérile et ajustée jusqu'à l'obtention d'un inoculum de 10^7 UFC/ml. L'inoculum préparé à partir de chaque souche est uniformément bien étalé à la surface de la gélose de MH. Des disques de papier Wattman n°4 stériles de 6 mm de diamètre sont déposés sur la gélose et chaque disque est imprégné d'une quantité de 30 μ l de l'huile essentielle. La lecture se fait après 18 à 24 h d'incubation à 37°C (**Kheyar et al., 2014**).

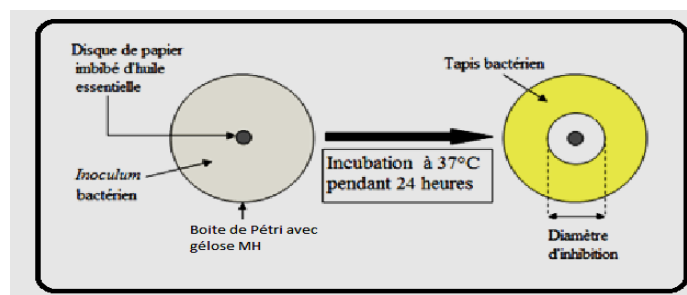


Figure 08 : Principe de la méthode de diffusion par disque (Guinoiseau, 2010)

IV-2.5.5. Détermination de la CMI par la méthode de dilution

La méthode utilisée dans cette expérimentation est celle décrite par **Guinoiseau, 2010**. Un volume bien déterminé (environ 400 μ l) de chaque huile essentielle à tester selon sa densité, est placé dans un tube stérile contenant 4,6 ml de milieu MHB, supplémenté en

Tween 80 (0,01 %, v/v) pour donner un volume total de 5ml. Une dilution en cascade est effectuée dans du milieu MHB-Tween 80 (0,01 %, v/v), de manière à obtenir une gamme de concentration comprise entre 80 mg.mL⁻¹ et 0,3 mg.mL⁻¹ (fig. 09).

Le tween a servi de dispersant des huiles dans l'eau. Il est à la fois miscible à l'huile et à l'eau (Toure, 2015).

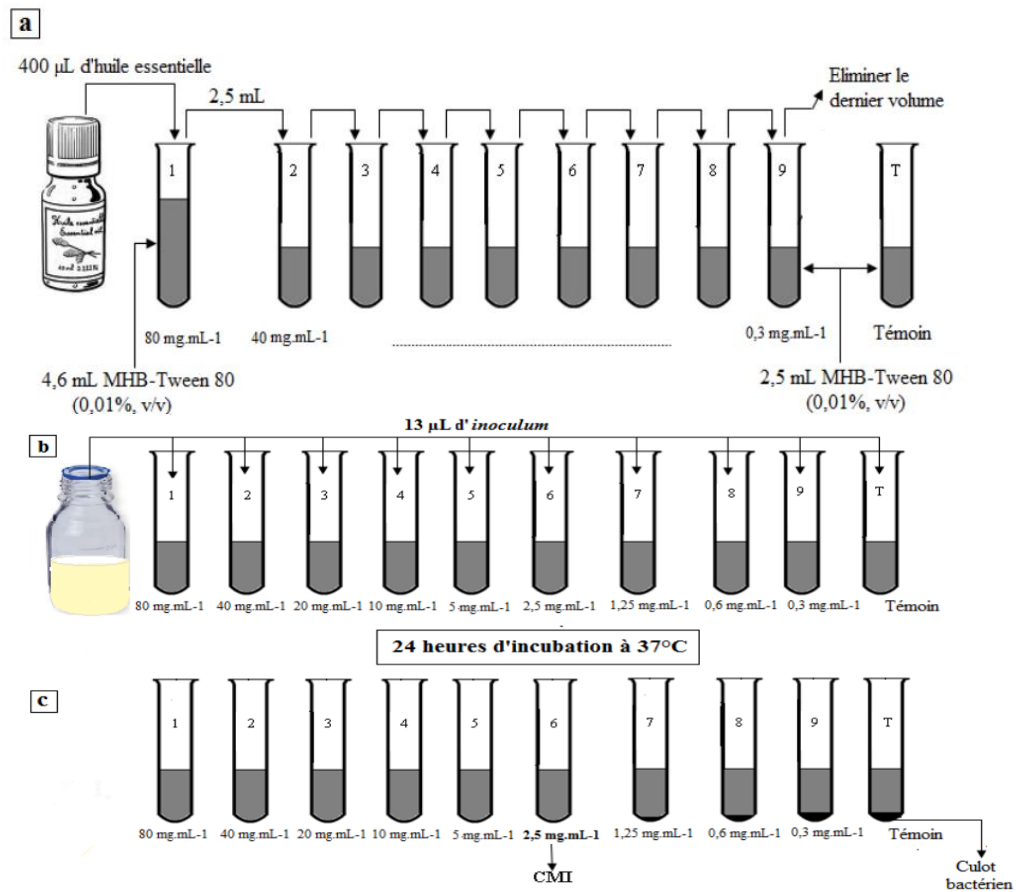


Figure 09: Méthode de détermination de la CMI en milieu liquide (Guinoiseau,2010)

Pour déterminer le volume de l'huile, peser un volume de ce dernier pur pour déterminer sa concentration initiale et calculer le volume nécessaire pour atteindre la concentration de 80mg/ml ; par exemple la masse de 50µl de l'huile de mois d'avril est de 25.8µg, donc le volume nécessaire c'est 155µl ; avec un volume de 4.845 ml de milieu de culture à but d'atteindre de 5ml.

IV-2.5.6. Détermination de la CMB en milieu solide

La CMB correspond à la plus faible concentration en huile essentielle capable de tuer plus de 99,9 % de l'inoculum bactérien initial (soit moins de 0,01 % de survivants). Elle

définit l'effet bactéricide d'une huile essentielle. La même gamme de concentration, réalisée par la technique de macro dilution en milieu liquide, est utilisée pour déterminer la CMI et la CMB de l'huile essentielle à tester (fig. 10).

Des prélèvements sont effectués dans le tube témoin et dans chacun des tubes dépourvus de culot bactérien puis déposés « en strie » sur gélose MH. Les boîtes ensemencées sont incubées 24 heures à 37°C (Guinoiseau, 2010).

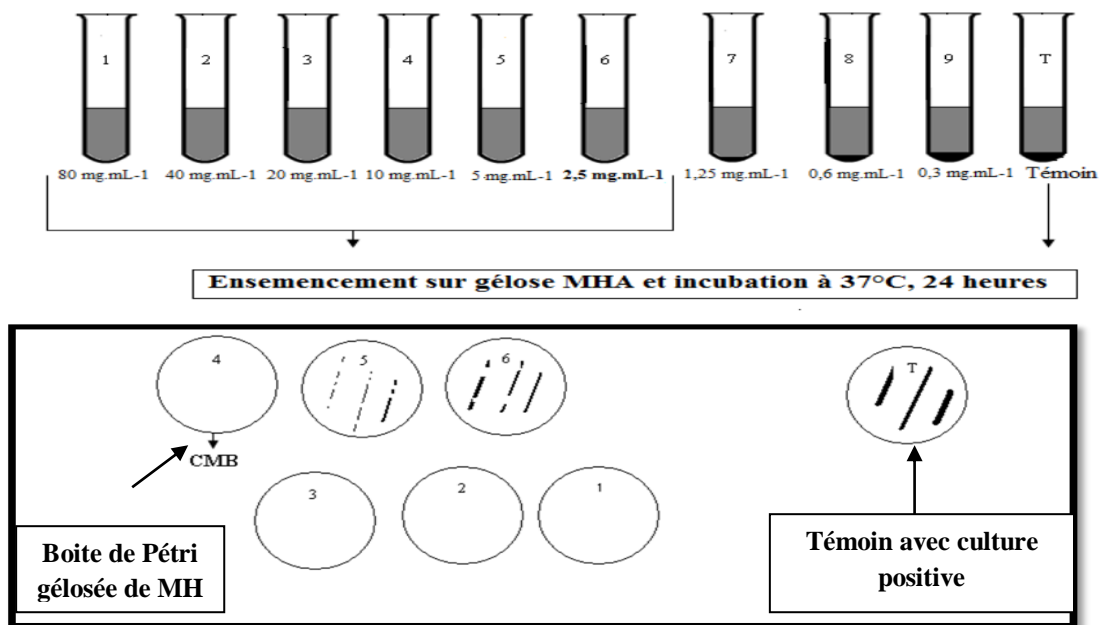


Figure 10 : Détermination de la CMB en milieu solide (Guinoiseau, 2010)

La CMB de chaque huile essentielle est déduite à partir de la première boîte dépourvue de bactérie.

IV-2.6. Activité antibactérienne des extraits phénoliques

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a été réalisée par la méthode de diffusion de disque où les disques sont imbibés de 10 µl de chaque extrait (Sokmen et al., 2004).

L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage sur boîtes Pétri gélosées de MH. Chaque extrait a été testé trois fois.

Résultats et discussion

V-1. Les HEs

V-1.1. Extraction

En fait, différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales. En général le choix de la méthode dépendra de la nature du matériel végétal à traiter (graines, feuilles, ramilles), de la nature des composés (par exemple, les flavonoïdes, les huiles essentielles, les tanins), le rendement en l'huile et la fragilité de certains constituants des huiles aux températures élevées (Hadji, 2013). Le choix de la méthode de l'hydrodistillation des HEs est dû à sa disponibilité et sa facilité. Également, elle est la méthode la plus ancienne et la plus utilisée. En revanche, la distillation ne permet pas d'extraire la totalité des principes actifs lourds d'un végétal mais seulement les composés volatils entraînés.

D'après l'hydrodistillation pendant 4h, des parties aériennes de la plante *A. santolina*, les extraits obtenus sont des substances hautement volatiles, d'une odeur aromatique, forte, et de couleurs différents (Fig. 11).



Figure 11 : Les huiles essentielles après hydrodistillation (photo original 2018).

V-1.1.1 Cinétique

Dans le but d'estimer la durée d'extraction réelle, nous avons mis en évidence une cinétique du volume en fonction du temps des HEs. La figure 12 montre que le rendement d'extraction augmente progressivement jusqu'à 2 heures pour atteindre l'état stationnaire (plateau).

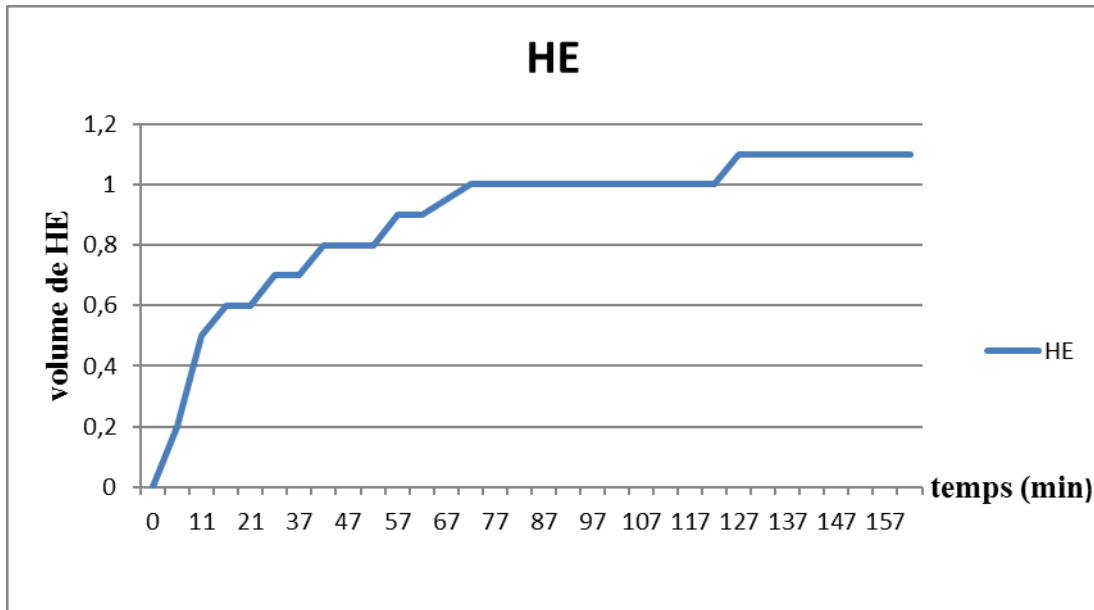


Figure 12 : Cinétique d'un extrait huileux par rapport au temps d'extraction.

D'après **Issabeagloo (2012)**, selon le protocole d'extraction adapté pour les HE, généralement, la durée est de 4 heures. Alors que dans notre cas, la cinétique d'extraction est de 2 heures seulement.

V-1.1.2. Rendement des HEs

Les rendements moyens des huiles essentielles ont été calculés par rapport à 100g du poids sec de la plante récoltée sur la période avril-aout (fig. 13).

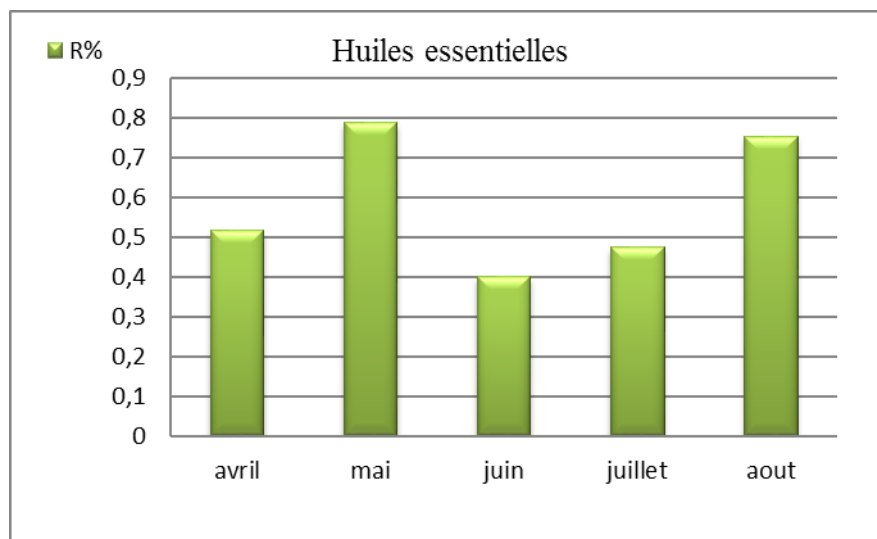


Figure 13 : Rendement en huile essentielle des cinq échantillons.

Les huiles essentielles ainsi obtenues par hydrodistillation à l'aide de Clevenger ont donné un rendement minimal de 0.4 % au mois de juin et un rendement maximal de 0,78% au mois de mai. Cette différence peut être expliquée par la variation du stade de croissance de la plante, végétative et de floraison (Shawl *et al.*, 2002).

V-1.2. Analyse chimique des HEs

L'analyse chimique des huiles essentielles d'*A. santolina* par chromatographie en phase gazeuse (CPG), nous a permis d'identifier 17 composés avec des pourcentages variés pour chaque huile (Tableau 04).

Tableau 04 : Composition chimique (%) des huiles essentielles d'*A. santolina*

IR	Composés	Gr	Avril	Mai	Juin	Juillet	Aout
1019	a-Thujene	Mh	-	0,59	0,6	0,3	-
1035	a-Pinene	Mh	0,26	0,2	4,1	3,2	0,22
1129	b-Pinene	Mh	0,23	0,56	1,01	0,95	0,1
1250	g-Terpinene	Mh	4,5	2,5	3,4	0,75	0,6
1276	p-cymene	Mh	1,2	0,56	3,1	0,67	0,9
1298	terpinelene	Mh	0	0,2	0,3	0,8	0,5
1517	Camphor	Mo	59,1	60,14	70,2	60,5	65,7
1588	Terpinene-4-ol	So	4.61	2.84	5.35	2.76	0,47
1769	<i>β-caryophyllene</i>	Sh	0.51	0.32	0.43	0.85	0,74
1843	<i>Myrtenol</i>	So	0.41	0.41	0.71	1.05	0,4
1852	p-cymen-8-ol	So	0.31	0.18	0.35	-	-
1898	<i>p-cymen-8-ol</i>	So	0.37	0.26	0.38	-	0,5
1992	<i>caryophyllene oxide</i>	So	0.12	0.17	0.26	0.79	0,26
2073	Viridiflorol	So	0.17	0.30	0,26	-	-
2178	thymol	So	0.10	0.18	-	-	-
2215	a-cadinol	So	0.12	-	-	1.10	-
2268	E,E-Farnesyl acetate	So	0.11	0.26	-	1.19	-

Liste des composés par leur élution sur la colonne UB-Wax. IR : Indice de rétention (formule dans l'annexe 08), Mh: monoterpène hydrocarboné, So : sesquiterpène oxygéné.

Les résultats de l'analyse chimique montrent que l'huile essentielle d'*A. santolina* contient du camphre comme constituant majoritaire. Ce résultat est en accord avec celui trouvé par Bader *et al.* (2003) où *A. santolina* a montré principalement des composés 1,8-cinéole (17,6%) et de camphre (17,5%), tandis que l'huile de *A. biebersteinii* contenait du

cis-ascaridole comme constituant principal. **Al-djaber et al., (2016)**, pour la même espèce de la Jordanie ont trouvé comme composés majoritaires l'eucalyptol (17.82%) et le camphre (11.12%).

L'huile essentielle d'*A. santolina* collecté de désert de Sinaa (Egypte) a révélé une concentration considérable en Thujene (8,4%) nettement plus élevé à celle trouvé par notre espèce. Avec des concentrations en eucalyptol et camphre (07.1%) et (06.7%), respectivement (**El-shazly et al., 2013**).

Dans les travaux de **Rustaiyan et al. (2011)**, ont montrés des concentrations majoritaires en camphre avec d'autres espèce d'*Achillea* (Iran); elles sont de l'ordre de 20% pour *A. talagonica* et 32% pour *A. vermicularis*.

Notre HE est caractérisée par une certaine égalité entre la fraction des sesquiterpènes qui est représentée par le Terpinene-4-ol (4.61%) et la fraction monoterpène hydrocarbonée dont 4.5% sont des g-Terpinene.

En effet, nos observations confirment que l'huile d'*A. santolina* apparaît comme un représentant typique du Camphre (type Camphane) en quantité relativement élevée en monoterpène oxygéné. La comparaison avec plusieurs rapports sur les espèces d'*Achillea* issues de différents lieux géographiques montre que les parties et le stade de croissance des plantes collectées influencent sur la constitution de l'huile essentielle (**Shawl et al., 2002**).

V- 1.3. L'activité antibactérienne

V-1.3.1. Tests de confirmation de la pureté des souches

Les résultats d'identification des souches testées sont présentés dans le tableau 05.

Tableau 05 : Résultats des tests de confirmation.

Souches	Examen microscopique après coloration de Gram	Test biochimique		
		catalase	oxydase	coagulase
<i>E. coli</i>	Coccobacille (-)	/	-	/
<i>P. aeruginosa</i>	Bacille (-)	/	+	/
<i>S. aureus</i>	Cocci en grappe de raisin (+)	+	/	+
<i>M. luteus</i>	Tétrade (+)	+	/	-
<i>B. cereus</i>	Bacille (+)	+	/	/
<i>B. subtilis</i>	Bacille (+)	+	/	/

La galerie Api système 20 E a été utilisée pour la confirmation de la souche *Escherichia coli*. Le système a codé pour une très bonne identification (Résultat illustré sur la figure 14).

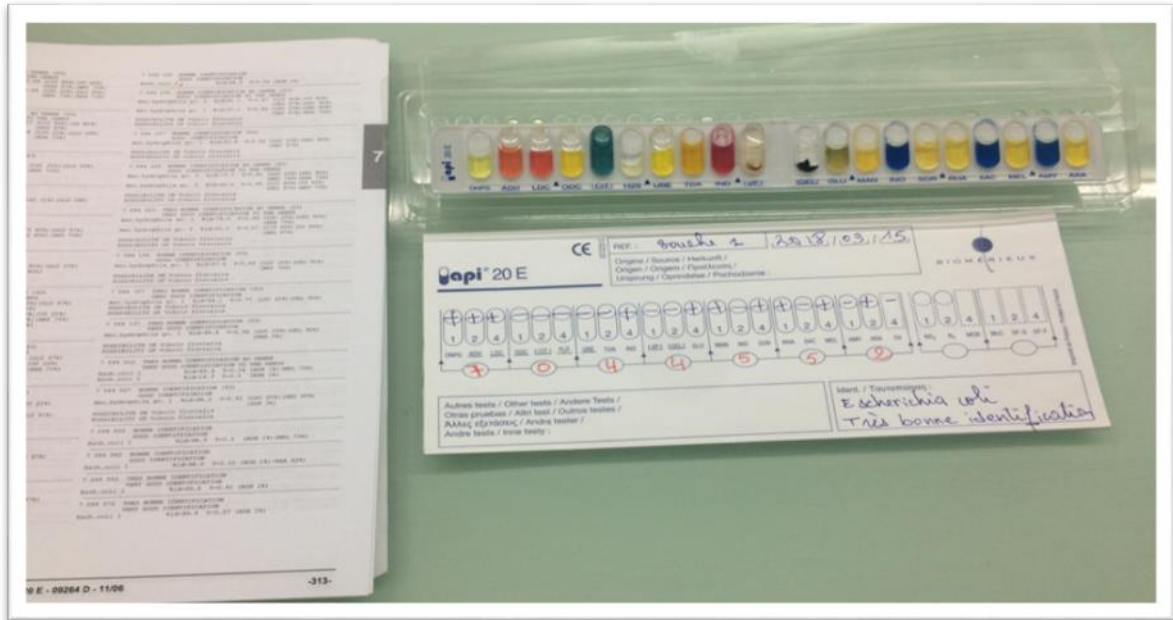


Figure 14: Résultat du système d'identification Api 20 E.

V-1.3.2. L'antibiogramme

L'antibiogramme consiste à rechercher la sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques choisis. Nous avons testé l'activité de deux antibiotiques pour chaque souche. Les mesures des zones d'inhibition figurant dans le tableau 06.

Tableau 06 : Résultats de l'antibiogramme (diamètre de la zone d'inhibition en mm).

Antibiotiques souches	Gn	OFX	NA	CL	E	DA	ATM	AK
E. coli	30	/	25	16	/	/	/	/
P. aeruginosa	/	17	/	/	/	/	25	30
M. luteus	30	/	/	/	20	/	/	/
B. subtilis	26	/	/	/	/	25	/	/
B. cereus	28	/	/	/	/	25	/	/
S. aureus	28	/	/	/	30	/	/	/

Gn : Gentamycine, E: Érythromycine, DA: Clindamycine, NA: Acide nalidexique, CL : Colistine, OFX : Ofloxacin, ATM : Aztreonam, AK : Amikacine, /: non testé.

Les résultats mentionnés montrent que le degré de sensibilité de chaque bactérie vis-à-vis des antibiotiques est différent d'une espèce à une autre. Les caractéristiques des zones d'inhibition révèlent que:

- ✓ *E. coli* est sensible à tous les antibiotiques testés;
- ✓ *P. aeruginosa* présente une résistance vis-à-vis de l'Ofloxacin; et une sensibilité à l'Amikacine et l'Aztreonam ;
- ✓ *M. luteus* est sensible à l'Erythromycine et très sensible à la Gentamycine ;
- ✓ *B. subtilis* et *B. cereus* présentent presque les mêmes zones de sensibilité vis-à-vis la Gentamycine et la Clindamycine.
- ✓ *S. aureus* est très sensible à la Gentamycine et l'Erythromycine.

V-1.3.3. L'aromatogramme:

La lecture des résultats se fait par la mesure des diamètres d'inhibition qui sont représentés par une auréole claire formée autour de chaque disque. Les résultats sont exprimés selon les niveaux d'activité :

Résistant ($D < 8$) R ; Sensible ($8 > D > 14$) S ; Très sensible ($15 > D > 19$) T.S ; Extrêmement sensible ($D > 20$) E.S (**Ponce et al., 2003**).

Tableau 07: Halos d'inhibition en mm provoqués par les cinq HE testées.

Huile testée de chaque mois	Souches bactériennes (Gram positif)				Souches bactériennes (Gram négatif)	
	<i>S. aureus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Avril	08 / S	12 / S	16 / T.S	12 / S	08 / S	R*
Mai	10 / S	10 / S	15 / T.S	12 / S	08 / S	R*
Juin	08 / S	09 / S	09 / S	13 / S	10 / S	R*
Juillet	08 / S	13 / S	R*	12 / S	09 / S	R*
Août	09 / S	09 / S	09 / S	14 / S	10 / S	07.5 / R

R* : Résistant (pas du diamètre d'inhibition).

- **Activité des HEs sur *Escherichia coli***

Les résultats obtenus indiquent que toutes les huiles ont montré un effet inhibiteur vis-à-vis d'*E. coli*. Des zones d'inhibition allant de 08 mm à 10 mm sont observées. Le meilleur résultat obtenu vis-à-vis de cette souche est celui de l'huile extraite durant le mois d'août avec un diamètre d'environ 10 mm.

- **Activité HEs sur *Pseudomonas aeruginosa***

Cette souche présente une très forte résistance contre les huiles essentielles testées, La seule zone d'inhibition observée est celle de l'huile extraite durant le mois d'Août. En effet cette zone de 7,5 mm, la souche est considéré comme résistante. Ce comportement n'est pas surprenant car les souches de *Pseudomonas aeruginosa* possèdent une résistance intrinsèque à une large gamme de biocides, associée à la nature de sa membrane externe. Cette barrière a une capacité de synthétiser et sécréter des agrégats structurés appelés biofilms ou matrice composés de polysaccharides. Ces biofilms forment une barrière physique contre l'entrée d'agents antimicrobiens et elle secrète aussi un complexe enzymatique extracellulaire qui peuvent dégrader les huiles essentielles (Kheyar, 2014).

- **Activité des HEs sur *Staphylococcus aureus***

L'activité des huiles essentielles sur cette souche n'est pas stable en fonction du mois de récolte et par conséquent d'extraction. Des diamètres d'inhibition allant de 08 à 10 mm ont été enregistrés.

- **Activité des HEs sur *Micrococcus luteus***

Les diamètres d'inhibition marqués contre la souche *M. luteus* est de 09 à 13 mm. La plus grande zone d'inhibition observée est celle du mois de juillet.

- **Activité des HEs sur *Bacillus cereus***

La souche a présenté une sensibilité élevée vis-à-vis les huiles essentielles testées, En terme de zones d'inhibition la bactérie a donné des diamètres allant de 08 à 16 mm.

- **Activité des HEs sur *Bacillus subtilis***

Les résultats obtenus par les tests préliminaires ont montré une sensibilité élevée avec des diamètres d'inhibitions allant de 12 mm jusqu'au 14 mm.

Les représentations graphiques des diamètres d'inhibition des bactéries étudiées vis-à-vis de différents huiles essentielles et antibiotiques sont regroupées dans les figures 15 et 16.

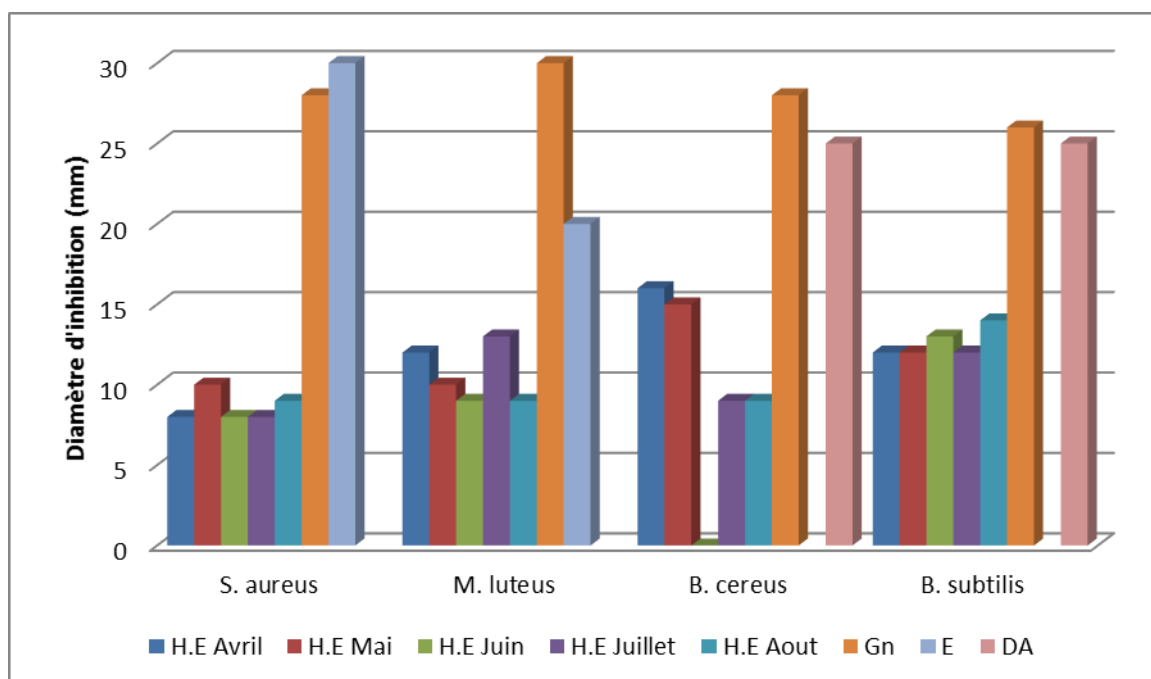


Figure 15: Représentation graphique des diamètres d'inhibition des bactéries à Gram positif vis-à-vis de différents huiles essentielles et antibiotiques (Gn : Gentamycine, E : Érythromycine, DA : Clindamycine).

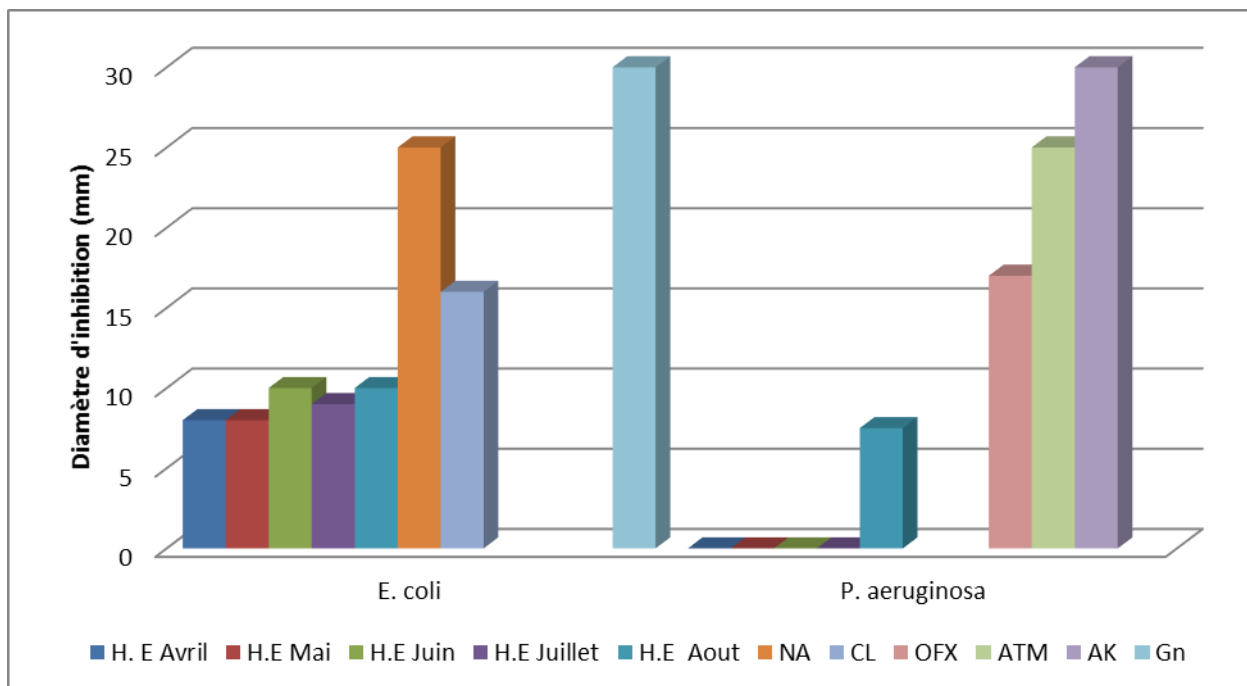


Figure. 16: Représentation graphique des diamètres d'inhibition des bactéries à Gram négatif vis-à-vis de différents antibiotiques et huiles essentielles NA : Acide nalidexique, CL : Colistine, OFX : Ofloxacine, ATM : Aztreonam, AK : Amikacine).

Ces résultats ont montré que les bactéries Gram positif sont plus sensibles que les bactéries Gram négatif. Cette sensibilité plus marquée des Gram (+) par rapport aux Gram (-) vis-à-vis des HEs a été déjà observée dans plusieurs études (Al-Snafi, 2013; Belhadj Salah-Fatnassi et al., 2017 et Zayyad et al., 2014).

La grande résistance des bactéries à Gram (-) est liée en partie à la complexité de la paroi cellulaire de ces microorganismes qui contient une double membrane, contrairement à la structure membranaire simple des bactéries à Gram positive (Poole, 2001).

V-1.3.4. CMI et CMB

Les résultats obtenus par la méthode de diffusion en disque nous ont conduits de faire confirmer quantitativement l'activité antibactérienne des huiles essentielles vis-à-vis les cinq souches bactériennes qu'ont montré une zone d'inhibition. L'évaluation quantitative de l'activité antibactérienne des huiles a été effectuée par la détermination de la CMI. Le rapport CMB/CMI permet de définir le caractère bactériostatique ou bactéricide d'une huile essentielle. Lorsque ce rapport est inférieur à 4, l'HE est considérée comme bactéricide (Guinoiseau, 2010).

Les résultats obtenus sont représentés dans les tableaux 08 et 09 :

Tableau 08 : Détermination de la CMI (mg/ml) et de la CMB (mg/ml) des huiles essentielles d'*A. santolina* sur les différentes souches étudiées.

Huiles essentielles (mois d'extraction)		Avril	Mai	Juin	Juillet	Août
<i>S. aureus</i>	CMI	05	10	05	20	20
	CMB	20	20	40	80	80
	CMI/CMB	4	2	8	4	4
<i>M. luteus</i>	CMI	05	10	20	20	20
	CMB	05	40	80	80	40
	CMI/CMB	1	4	4	4	2
<i>B. cereus</i>	CMI	02.5	80	/	40	10
	CMB	02.5	80	/	40	20
	CMI/CMB	1	1	/	1	2
<i>B. subtilis</i>	CMI	10	80	20	10	40
	CMB	40	80	80	40	/
	CMI/CMB	4	1	4	4	/
<i>E. coli</i>	CMI	05	10	05	40	10
	CMB	05	20	05	40	20
	CMI/CMB	1	2	1	1	2

Les résultats des CMI et CMB de toutes les huiles ont présenté une activité bactéricide vis-à-vis d'*E. coli*. D'après les rapports des CMB/CMI de toutes les huiles on peut constater que l'activité est stable pour les cinq huiles étudiées.

Pour l'espèce de *S. aureus*, les rapports des CMB/CMI l'effet de l'huile d'*A. santolina* est considérée comme bactéricide sauf celle du mois de juin qui a un effet bactériostatique.

Toutes les huiles testées ont une activité bactéricide contre *B. subtilis* et *M. luteus*.

B. cereus est la souche la plus sensible et elle a donnée des valeurs de rapports CMB/CMI stables. Toutes les huiles testées sur cette souche ont une activité bactéricide (Tableau 09).

Tableau 09 : Détermination des CMI et CMB de la Gentamycine vis-à-vis les souches étudiées.

Les souches	CMI	CMB	CMB/CMI
<i>E. coli</i>	0,3	0,3	1
<i>S. aureus</i>	0,3	0,3	1
<i>B. cereus</i>	0,3	0,3	1
<i>B. subtilis</i>	0,3	0,3	1
<i>M. luteus</i>	0,3	0,3	1

V-2. Les composés phénoliques

V-2.1 Extraction et rendement

D'après la littérature, l'influence des conditions d'extraction sur les rendements des composés phénoliques d'origine végétale a été reporté, tels que le temps et la température d'extraction, le pH, la composition chimique des échantillons et la polarité du solvant (Jayaprakasha et Patil., 2007).

Nous avons fait recours à la méthode de sonication, utilisant les ultrasons avec des fréquences ne dépassant pas les 20 kHz, car elle rapide et augmente la perméabilité des parois cellulaires ce qui permet d'extraire le maximum des composants bioactifs.

Les rendements d'extraction pour les cinq échantillons (fig.17) sont indiqués dans la figure 16, qui présente une variation de pourcentage d'un mois à un autre.

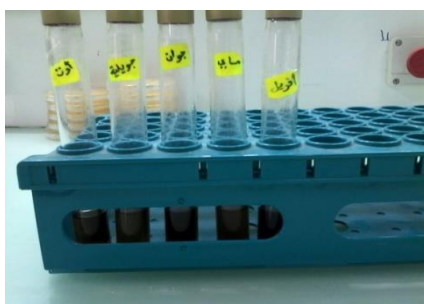


Figure17: Les extraits phénoliques bruts.

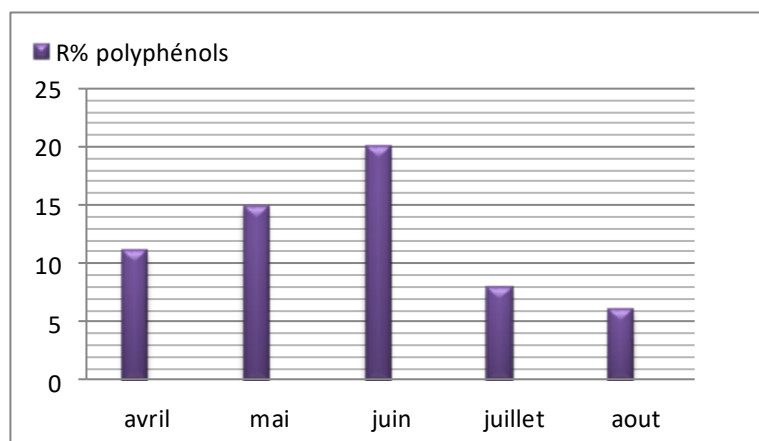


Figure 18: Rendement en composés phénoliques des cinq échantillons.

Le rendement le plus élevé (20.02%) en composés phénoliques a été obtenu au cours du mois de juin. Cette différence en rendement (huile et phénols) peut être expliquée par la variation du stade de croissance de la plante (Shawl et al., 2002).

V-2.2. Activité antibactérienne des extraits phénoliques bruts

Nos résultats montrent que l'ensemble des extraits phénoliques bruts d'*A. santolina* n'ont aucune activité antibactérienne appréciable vis-à-vis des germes testés et avec la concentration utilisée (10µl). Par ailleurs, de faibles zones d'inhibition ont été observées autour des disques imbibés d'extrait du mois de Mai contre la souche *Escherichia coli* ; cette zone est de l'ordre de 07 mm (Résultats illustrés dans l'annexe 06).

Ce résultat est vraisemblablement tributaire de la composition chimique de nos échantillons qui ne possède pas de pouvoir antimicrobien. Par contre et d'après la littérature, les composés phénoliques et flavonoïdes ont été prouvés d'être des agents antimicrobiens et antifongiques (Daglia, 2012 ; Dorsaz et al., 2017).

V-3. Discussion générale

D'après les zones d'inhibition générées par les huiles essentielles étudiées, l'huile essentielle extraite à partir de la plante récoltée durant le mois d'Aout présente la meilleure activité sur les souches Gram négatif.

L'huile du mois de Mai possède les CMI les plus élevées. Elle est donc la moins active sur les souches bactériennes étudiées.

Les diamètres générés par les huiles essentielles, sont nettement inférieurs à ceux produits par les antibiotiques et très variable selon l'huile utilisée. L'activité des huiles essentielles qui sont des mélanges complexes de plusieurs molécules, sont généralement inférieures à celle exercée par les antibiotiques (**Toure, 2015**). En comparant les résultats des CMI, nous avons constaté que toutes les huiles essentielles étudiées sont nettement moins actives sur les bactéries testées que la Gentamycine.

En comparant la susceptibilité des différentes souches vis-à-vis des huiles testées, nous constatons que l'efficacité de ces huiles diffère d'une bactérie à une autre.

B. cereus est la plus sensible cependant, *P. aeruginosa* est la plus résistante aux huiles testées. En effet, *P. aeruginosa* possède une résistance intrinsèque aux agents biocides, en relation avec la nature de sa membrane externe. Cette dernière est composée de lipopolysaccharides qui forment une barrière imperméable aux composés hydrophobes.

En présence d'agents perméabilisant de la membrane externe, des substances inactives contre *P. aeruginosa* deviennent actives (**Mann et al., 2000**). Il semble que cette souche se révèle résistante à un très grand nombre d'huiles essentielles (**Hammer et al., 1999 ; Deans et Ritchie., 1987**).

En générale, nous avons remarqué que les bactéries à Gram positif montrent la plus grande sensibilité vis-à-vis les huiles essentielles. **Bekhechi et Bekkara., (2011)** ont montré mêmes effets antimicrobiens des huiles essentielles d'*A. Odorata* provenant du nord-ouest de l'Algérie. La structure de la paroi cellulaire des bactéries Gram positives les rend toutefois plus sensibles à l'action des huiles essentielles (**Burt, 2004**). **Al-Snafi (2013)** a trouvé des résultats similaires à nos résultats avec une CMI de 40 ppm contre une souche de *S. aureus* et un effet négligeable contre une souche de *P. aeruginosa* (la plante d'*A. santolina* a été récoltée dans la région de l'Iraq).

Les travaux d'**Ahmadi et ces collaborateurs (2011)** ont montré que la souche testée de *S. aureus* a une très grande sensibilité vis-à-vis l'extrait d'*A. santolina*, avec une CMI (> 0.573 mg/l) et CMB (> 1.146 mg/l).

La composition chimique des huiles essentielles étudiées pour leur activité antibactérienne est dominée par la présence de la molécule du camphre hydrocarboné.

Nous avons remarqué que l'HE du mois de Juin contient le pourcentage le plus élevé en camphre (70,2%), alors que l'activité antibactérienne de cette huile était relativement faible. Le rapport liant l'activité antibactérienne des huiles essentielles à leurs principaux constituants, ne sont pas applicables à l'huile d'*A. santolina*.

Il est établi aussi dans de nombreux travaux que l'activité d'une huile essentielle est en rapport avec les composés majoritaires et les possibles effets synergiques entre les constituants (**Oussou et al., 2010**).

Cependant, l'activité antibactérienne des huiles essentielles étudiées serait alors attribuable à une ou plusieurs molécules actives présentes en faible proportion dans les huiles essentielles.

De façon générale, il a été observé une diversité d'actions toxiques des huiles essentielles sur les bactéries comme la perturbation de la membrane cytoplasmique, la perturbation de la force motrice de proton, fuite d'électron et la coagulation du contenu protéique des cellules (**Davidson, 1997**). Le mode d'action des huiles essentielles dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne. Cela peut induire un changement de conformation des enzymes de la membrane, une perturbation chémo-osmotique et une fuite d'ions (K⁺) (**Toure, 2015**).

Contrairement aux huiles essentielles, les extraits phénoliques ont été inactifs sur les différentes souches étudiées. **Benedec et al., (2013)** ont trouvé des effets allant de non actifs jusqu'aux peu actifs par les extraits phénolique de la plante *A. distans*. Actuellement, la recherche scientifique a confirmé que les extraits de plantes sont dotés d'inhibiteurs antibactérien et antifongique très efficaces (**Daglia, M., 2012 ; Dorsaz et al., 2017**). Cependant ils peuvent, potentiellement, constituer une alternative très efficace et valable, surtout que la résistance des bactéries aux antibiotiques, depuis plusieurs années, s'est révélé un important problème (**Grare, 2009 ; Djabali , 2012**).

Conclusion

Les huiles essentielles sont des substances aromatiques, d'une composition chimique complexe, ce qui leur confère des propriétés antibactériennes très intéressantes à mettre à profit d'une part dans la préservation des produits alimentaires et d'autre part dans l'aromathérapie.

L'extraction de l'huile essentielle d'*A. santolina* de la région d'El-Bayadh a été effectuée par hydrodistillation. La détermination du rendement en huile essentielle a montré une rentabilité allant de 0.400% jusqu'à 0,790%. L'analyse chimique de cette huile essentielle par la CPG a révélé une concentration très élevée en camphre.

L'extraction des composés phénoliques d'*A. santolina* a été réalisée par la méthode de l'ultrason. Ce processus a permis d'obtenir cinq extraits, avec un rendement très important, de l'ordre de 20.10% pour le mois de juin.

Les travaux menés par notre étude ont permis de mettre en évidence l'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*A. santolina* à l'encontre des bactéries étudiées. Nous avons constaté que les souches les plus sensibles à cette HE sont : *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*. En revanche *Pseudomonas aeruginosa* a manifesté une résistance à l'égard des extraits essentiels.

D'après les tests préliminaires et la détermination des CMI et CMB, nous avons constaté que la meilleure période de récolte pour l'extraction de l'huile essentielle de notre plante est durant le mois d'Avril.

En conclusion, l'huile essentielle d'*A. santolina* a des activités assez intéressantes sur les bactéries pathogènes testés. Tandis que l'extrait phénolique est dépourvu d'un pouvoir antibactérien. Il a été constaté que ces activités varient en fonction de la souche microbienne testée et la période de récolte de la plante. Ces caractéristiques importantes font de cette huile un patrimoine à utiliser dans les dermatites allergiques en raison de la facilité de l'appliquer sur la peau.

Sachant que notre pays possède une biodiversité immense dont chaque plante se caractérise par un réservoir assez important de métabolites secondaires avec des caractéristiques thérapeutiques et pharmacologiques particulières qui demandent d'être exploitées par les recherches, de cet effet, et comme perspectives on propose de :

- Continuer ces travaux notamment sur d'autres bactéries pathogènes, afin de confirmer l'efficacité ou non des extraits d'*A. santolina*.
- Tester le mélange de ces extraits à fin de vérifier l'existence d'une éventuelle synergie.
- Analyser cette huile essentielle par chromatographie (HPLC, CPG/SM).
- Réaliser des tests *in vivo* pour évaluer certaines activités thérapeutiques.

Références bibliographiques

A

Ahmadi, Z., Sattari, M., Tabaraee, B., et Bigdeli, M. (2011). Identification of the constituents of *Achillea santolina* essential oil and evaluation of the anti-microbial effects of its extract and essential oil. Rev: ArakMedical University Journal (AMUJ). V14(56). P1-10.

Akroum, S. (2011). Etude analytique et biologique des flavonoïdes naturels. Thèse de Doctorat. Université Mentouri de Constantine. P12-13.

Al-Jaber, H.I., Hammad, H.M., Al-Qudah, M.A., Abaza, I.F., Al-Humaidi, J.Y., Khater, D.F., Saleh, A.M., Barham, M., Abu-Zarga, M.H. et Afifi, F.U. (2016). *Achillea santolina*: Growth dependent variation in essential oil composition and some in-vitro bioactivity studies. Rev: European Journal of Medicinal Plants. V13(1). P1-11.

Alkurd, A., Hamed, T. R., et Al-Sayyed, H. (2008). Tannin Contents of Selected Plants Used in Jordan. Rev: Jordan. J. Agric. Sci. V 4. P265- 274.

Ammari, H., Rahal, K., Benslimani, A., Tali-Maamar, K., Missoum, M.F.K., Kechih-Bounar, S. (2011). Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale (Médecine humaine et vétérinaire). Document édité avec la collaboration de l'OMS. 6^{ème} édition.

Al-Snafi, A. E. (2013). Chemical Constituents and Pharmacological Activities of Milfoil (*Achillea santolina*). Rev: International Journal of PharmTech Researchcoden (USA). V5(3). P1373-1377.

Avril, J. L., Dabernat, H., Denis, F. et Monteil, H. (1992). Bactériologie clinique. 2^{ème} édition. Ellipses.

B

Bader, A., Flamini, G., Cioni, PL., Morelli, I., (2003). Essential oil composition of *Achillea santolina* L. and *Achillea biebersteinii* Afan. collected in Jordan. Rev: Flav. Fragr. J. P18. P36-38.

Baird-Parker, A. C. (1962). A Classification of Micrococci and Staphylococci based on physiological and biochemical Tests. Research Laboratory. Ed: Colworth House, Sharnbrook. Bedford.

Bakhoun, I. (2004). Contrôle de qualité et validation de différentes micro-méthodes d'identification bactérienne. Thèse Pharmacie. n° 8.

Bakkali ,F., Averbeck, S., Averbeck, D., et Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils. Rev: Food Chem Toxicol. V 46. P446-475.

Basli, A., Chibane, M. Madani, K. Oukil, N. (2012). Activité antibactérienne des polyphénols extraits d'une plante médicinale de la flore d'Algérie : *Origanum glandulosum* Desf. Rev : Phytothérapie. V10. P2-9

Baser KHC., Buchbauer G., (2010). Handbook of Essential oils : Science, Technology and Applications. CRC Press. UK.

- Bekhechi, C. and Bekkara, F. T. (2011).** Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Achillea odorata* L. subsp. *pectinata*(Lamk) var. *microphylla*(Willd.) Willk. From Northwestern Algeria. Rev: Journal of Essential Oil Research. V23.
- Belhadj Salah-Fatnassi, K., Hassayoun, F., Cheraif, I., Khan, k., Benjannet, H., Hammami, M., Aouni, M. and Harzallah-Skhiri, F. (2017).** Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of flowerhead and root essential oils of *Santolina chamaecyparissus* L., growing wild in Tunisia. Rev: Saudi Journal of Biological Sciences. V24. P875-882.
- Benedec, D., Vlase, L., Oniga, I., Augustin, C. M., Damian, G., Hanganu, D., Duma, M. (2013).** Polyphenolic Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities for Two Romanian Subspecies of *Achillea distans*. Rev: 5and Radu Silaghi-Dumitrescu journal molecules.
- Bondi, D., Cianci, P., Geraci, C., Giuseppe, R. (1993).** Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils from Sicilian aromatic plants. Rev: FlavourFrag J. V8. P331-7
- Bouallal, M., Bradai, L., et Abid, M. (2014).** Diversité et utilisation des plantes spontanées du Sahara septentrional algérien dans la pharmacopée saharienne. Cas de la région du Souf. Rev : ElWahat pour les Recherches et les Etudes. V7(2). P16 – 24.
- Boudet, A.M. (2000).** L'usine chimique. 9^{ème} conférence de l'université de tous les savoirs. France. P1-16.
- Boudjerda, A., Zater, H., Benayache, S., Chalchat, J.C., Gonzalez-Platas, J., Leo'n, F., Brouard, I., Bermejo, j., Benayache, F. (2008).** A new guaianolide and other constituents from *Achillea ligustica*. Rev: Biochemical Systematics and Ecology V36. P461-466.
- Boudjerda, A. (2013).** Recherche et Détermination Structurale des Métabolites Secondaires de *Achillea ligustica* (*Anthemideae*), et *Ranunculus cortusifolius* (*Ranunculaceae*). Thèse de doctorat. Université Mentouri- Constantine. P9.
- Bouguerra, A. (2012).** Etude des activités biologiques de l'huile essentielle extraite des graines de *Foeniculum vulgare* Mill. en vue de son utilisation comme conservateur alimentaire. Magister en Sciences Alimentaires. Université Mentouri Constantine. P20.
- Bouhairi, S. (2017).** *Bacillus subtilis* : Caractères et applications. Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat. Maroc. Thèse doctorat.
- Boulos, L. (2002).** Flora of Egypt. Al Hadara Publishing. Cairo Egypt. V3. P 249.
- Bouzabata, A. (2013).** Traditional treatment of high blood pressure and diabetes in Souk Ahras District. Rev: Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy. V5(1). P12-20.
- Breed, R. S., Murray, E. G. D. et Smith, N. R. (1957).** Bergey's manual of determination bacteriology. Seventh edition. Baltimore the Williams and Wilkins company.

Bruneton, J. (1999). Huiles essentielles, In Pharmacognosie: phytochimie, plante médicinales. Tec & Doc, Lavoisier, 3ème éd. (Paris). P1120.

Bruneton, J. (2008). Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. 2ème Edition, Tec & Doc, Lavoisier, Paris. P1188.

Bruno, M., Herz, W. (1988). Sesquiterpene lactones and γ -avones from *Centaurea cineraria* subsp umbrosa. Rev:Phytochemistry . V27. P1873-1875.

Burt, S.A. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods . Rev : Int. J. Food Microbiol. V94. P223-253.

C

Cowan, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. Rev: Clinical microbiology. V 12 (4). P564-570.

D

Daglia,M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. Rev : Current Opinion in Biotechnology. V 23. P174-181.

Dantas, R.C., Ferreira, M. L., Gontijo-Filho, P. P et and Ribas, R. M. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia: independent risk factors for mortality and impact of resistance on outcome. Rev: Journal of Medical Microbiology. V63. P1679-1687.

Davidson, P.M. (1997). Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. M. P.Doyle, L. R. Beuchat and T. J. Montville (eds.) ASM, Washington. Rev: Food Microbiology. P520-556 .

Deans, S.G., et Ritchie, G. (1987). Antibacterial properties of plant essential oils. Rev: International Journal of Food Microbiology. V5. P165-180.

Djabali ,S. (2012). Effet des polyphénols sur la résistance à l'infestation fongique dans le grain d'haricot sec. Mémoire de magister en sciences alimentaires (I.N.A.T.A.A), Université Mentouri-Constantine.

Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Vidal N. Lesgards JF. Stocker P. (2007). Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity. Rev: Eur Food Res Technol. V224. P801-809.

Dorsaz,S., Snäkä,T., Favre-Godal,Q. Maudens,P., Boulens,N., Furrer,P., Ebrahimi,S.N., Hamburger,M., Allémann,E., Gindro,K., Queiroz,E.F., Riezman,H., Wolfender,J.L., Sanglard,D. (2017). Identification and Mode of Action of a Plant Natural Product Targeting Human Fungal Pathogens. Rev: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, V 61 (9). p829.

Druyne, T. (1999). Condensed vegetable tannins: biodiversity in structure and biological activities. Rev: Biochem. Syst. Ecol. V27 (4). P445-59

E

Eberhard, T., Robert, A., et Annelise, L. (2005). Plantes aromatiques, épice aromates, condiments et huiles essentielles. Tec et Doc. Lavoisier (Paris).

El-Shazly, A.M., Hafez, S.S., Wink, M. (2004). Comparative study of the essential oils and extracts of *Achillea fragrantissima* (Forssk.) Sch. Bip. and *Achillea santolina* L. (Asteraceae) from Egypt . Rev: Pharmazie. V59. P226–230.

F

Farnsworth, N.R., Akerele, O., Bingel, A.S., Soejarto, D.D. et Guo, Z. (1986). Places des plantes médicinales dans la thérapeutique. Rev : Bulletin de l'organisation mondiale de la santé. V64 (2). P159-164.

G

Gueye, O. (2007). Utilisation des méthodes biométriques dans l'identification de quelques bacilles à Gram négatif. Thèse de pharm., n° 36.

Girault, M., Bougeon, J. (1971). L'aromatogramme. Rev : Cahier de biothérapie (n°29).

Grare, M. (2009). De la genèse d'une nouvelle classe d'antibactériens à base de polyphénols cycliques de type calixarène : études moléculaire(s), cellulaires(s) et structurale(s) en vue de l'identification des cibles d'action : le cas du para-guanidinoéthylcalixarène. Thèse de doctorat en Pharmacologie, Nancy 1.

Guillaume, G., (2017). La chromatographie en phase gazeuse: principe et exemples d'applications (1/2). Site Culture Sciences-Chimie. École Normale Supérieure éducol.

Guinoiseau, E. (2010). Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action. Université de Corse-Pasquale Paoli. P49-50 ; et P114.

H

Hadji, W. (2013). Valorisation des huiles essentielles : Cas de l'utilisation de l'huile de cade dans les eaux. Thèse de magister. Université Kasdi Merbah Ouargla.

Hammer, K. A., Carson, C. F. and Riley, T. V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. Rev: Journal of Applied Microbiology. V86(6). P985-990.

Hammoudi, R., Hadj, M.M., Ramdane, F., et Khodir, A. (2012). Activité antibactérienne des extraits phénoliques de la plante *Teucrium polium geyrii*. Rev : Algerian journal of arid environment. V 2(n°1).P49-55.

Hans, W.K. (2007). 1000 plantes aromatiques et médicinales. Terre édition. P6-7.

Hart, T et Shears, P. (1997). Atlas de poche de microbiologie. Flammarion.

Harborne, J.B. (1980). Plant Phenolics: Encyclopedia of Plant Physiology. New series. V8. P329-402.

Havsteen, B.H. (2002). The biochemistry and medical significance of flavonoids. Rev: Pharmacol. Ther. V96. P67–202

I

Issabeagloo, E., (2012). Antimicrobial effects of yarrow (*Achillea millefolium*) essential oils against *Staphylococcus* species. Rev: African Journal of Pharmacy and Pharmacology. V6(41). P2895-2899.

Iwueke, A.V. et Nwodo, O.F.C. (2008). Antihyperglycaemic effect of aqueous extract of *Daniella oliveri* and *Sarcocephalus latifolius* roots on key carbohydrate metabolic enzymes and glycogen in experimental diabetes. Rev: Biokemistri. V20. P63-70.

J

Jayaprakasha, G., et Patil, B. (2007). In vitro evaluation of the antioxidant activities in fruit extracts from citron and blood orange. Rev: Food Chemistry. V101. P410-418.

K

Kalemba, D., et Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Rev : Current Medicinal Chemistry. V 10. P813-829.

.Khadri, S. (2009). Evaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de l'ail cultivé (*Allium sativum*) de l'est Algérien vis-à-vis de différentes souches de *Pseudomonas aeruginosa*. Magister en Biochimie. Université Badji Mokhtar. P10.

Kheyar, N., Meridja, D. et Belhamel, K. (2014). Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Inula viscosa*, *Salvia officinalis* et *Laurus nobilis* de la région de Bejaia. Rev : Algerian J. Nat. Products. P18-26.

L

Labiod, R. (2016). Valorisation des huiles essentielles et des extraits de *Satureja calamintha nepeta* : activité antibactérienne, activité antioxydante et activité fongicide. Thèse de Doctorat Université Badji Mokhtar. P9, 18.

Lakhdar, L. (2015). Evaluation de l'activité antibactérienne d'huiles essentielles marocaines sur *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* : étude *in vitro*. Thèse de doctorat. Université Mohammed V Rabat. P26-27.

Le Loir, Y., et Gautier, M. (2010). *Staphylococcus aureus*. Ed LAVOISIER.

Lourici, L. (2004). Contribution à l'étude des indices de rétention en chromatographie gazeuse. Université Badji Mokhtar-Annaba. Thèse de doctorat. P 75.

M

Macheix, J.J., Fleuriet, A. et Jay-Allemand, C.H. (2005). Les composés phénoliques des végétaux. Ed Presses Polytechniques et Universitaires Romandes. P192.

McCurdy, C. R. et Scully, S. S. (2005). Analgesic substances derived from natural products (natureceuticals). Rev : Life Sciences. V78. P476-484.

Mann, C.M., Cox, S.D. et Markham, J.L. (2000). The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749 contributs to its tolerance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Tea tree oil). Rev: Letters in Applied Microbiology. V30. P294-297.

Millogo, H., Guisson, I.P., Nacoulma, O. et Traore, A.S. (2005). Savoir traditionnel et médicaments traditionnels améliorés. Colloque du 9 décembre. Centre européen de santé humanitaire –Lyon.

N

Nuzhat, T., et Vidyasagar, G.M. (2013). Antifungal Investigations on plant essential oils a review. Rev : Academic Sciences International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. V5 (2). P19-28

O

Oussou, K.R., Youlou, S., Kanko, C., Tue Bi, B., Kanko, C., Boti, J.B., Ahibo, C., et Casanova, J. (2010). Etude Chimique Bio-Guidée de L’huile Essentielle de *Ocimumgratissimum* (Lamiaceae). Rev :European Journal of Scientific Reaserch. V1. P50-59.

Ozenda, P. (1958). Flore du Sahara septentrional et central. Ed. CNRS, Paris, P485 .

P

Percival, S.L. (2004). Microbiology of waterborne diseases. Ed. Elsevier Academic Press, Amsterdam. Boston. P 480.

Piquemal, G. (2008). Les flavonoïdes (en ligne): http://www.detoursante.com/index.php?Option=com_content&view=article&id=166&Itemid=215.

Ponce, A.G., Fritz, R., Del Valle, C. et Roura, S.I. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. Rev: Lebensm.-Wiss.u.-Technol. V 36. P679-684.

Poole, K. (2001). Multidrug resistance in Gram-negative bacteria. Rev: Current Opinion in Microbiology. V4(5). P500-508.

Pourmortazavi, S.M., et Hajimirsadeghi, S.S. (2007). Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis, Rev: Journal of Chromatography A. V1163. P2-24.

Q

Quezel et Santa. (1962). Nouvelle flore de l’Algérie. Ed : éditions du centre nationale de la recherche scientifique .Paris. Tome I. P990.

Quézel, P., et Santa, S., (1963) Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II. Edition du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris. P788-789.

R

Rahal, k., Benslimani, A., Tali-maamar, H., Missoum, M. F. K., Kechih-Boumar, S., et Ammari, H. (2011). Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle National. Document édité avec la collaboration de l'OMS. 6^{ème} édition.

Rahimmaleka.M., Tabatabaeib, B.E.S., Etemadic, N., Golid, S.A.H., Arzania,A. et Zeinalie, H. (2009). Essential oil variation among and within six *Achillea* species transferred from different ecological regions in Iran to the field conditions. Rev: Industrial crops and products.V 2 (9). P348-355.

Ramawat, K.G., et Mérillon, J.M. (2008). Bioactive Molecules and Medicinal Plants, ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Rustaiyan, A., Komeilizadeh, H., Mercedeh, S.S., Jassbi A., et Masoudi, S. (2011). Comparative Study of the Essential Oils of Three *Achillea* Species from Iran. P207-209.

S

Sarni-Manchado, P., et Cheynier, V. (2006). Les polyphénols en agroalimentaire. Ed Lavoisier. P2- 10.

Sasaki, K., et Takahashi, T. (2002). A flavonoid from *Brassica rapa* flower as the UV-absorbing nectar guide. Rev: Phytochem., V61 (3). P339-43.

Schiestl, F.P., Ayasse, M., Paulus, H.F., Löfstedt, C., Hansson, B.S., Ibarra, F., et Francke, W. (2000). Sex pheromone mimicry in the early spider orchid (*Ophrys sphegodes*): patterns of hydrocarbons as the key mechanism for pollination by sexual deception. Rev: J. Comp.Physiol. Sensory Neural Behav. Physiol., V186 (6). P567-74.

Shahat, A.A.,Cos, P., Bruy ne, T.D. , Apers, S., Hammouda, F.M., Ismail, S.I. Azzam, S., Claeys, M Goovaerts, E., Pieters, L., Berghe, D.V. and Vlietinck, A.J. (2002). Antiviral and Antioxidant activity of Flavonoids and Proanthocyanidins from *Crataegus sinatica*, . Planta Med, 68, 539-541.

Shawl, A.S., Srivastava, S.K., Syamasundar, K.V., Tripathi, S. et Raina, V.K. (2002). Essential oil composition of *Achillea millefolium* L. growing wild in Kashmir, India. Rev: Flavour Fragrance.J. V17. P165-168.

Side Larbi K, Meddah B, Tir Touil Meddah A and Sonnet P. (2016). The antibacterial effect of two medicinal plants inula viscosa, anacyclus valentinus (asteraceae) and their synergistic interaction with antibiotic drugs. J. Fundam. Appl. Sci. V8(2). P244-255.

Simonpoli, P., (1993). Arburi, Arbe, Arbigliule, Savoirs Populaires sur les Plantes de Corse. Parc Naturel Regional de la Corse, Ajaccio, Corsica.

Sokmen, A., Gulluce, M., AskinAkpulat, H., Daferera, D., Tepe, B., Polissiou M., Sokmen, M. and Sahin, F. (2004). The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. Rev: FoodControl.V 15. P627-634.

T

Toure, D. (2015). Etudes chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques medicinales de côte d'ivoire. Chimie organique. Université Felix HouphoetBoigny, Côte d'Ivoire.

U

Urquiaga, I., et Leighton, F. (2000). Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. Rev: Biol. Res.V33. P55-64.

V

Valant-Vetschera, K. M. and Wollenweber , E. (1988). Leaf flavonoids of the *Achillea millefolium* group part II: Distribution patterns of free aglycones in leaf exudates. Rev: Biochem. Syst. Ecol. V16. P605-614.

W

Wichtel, M., et Anton, R. (1999). Plantes thérapeutiques : tradition pratique, officinale, science et thérapeutique. Ed. Tech. et Doc.

Y

Yi-Cai, F.U., Xi-Peng, J.I.N., Shao-Min, W.E.I., Hui-Feng, L.I.N., Sam, K. (2000). Ultraviolet radiation and reactive oxygen generation as inducers of keratinocyte apoptosis : Protective role of tea polyphenols. Rev: J. Toxicol. Environ. Health. V61 (3). P177-88.

Z

Zayyad, N., Abdellah, F. et Bahhou, F., (2014). Analyse chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles des trois espèces de Thymus : *Thymus zygis*, *T. algeriensis* et *T. bleicherianus*. Rev : Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège. V83. P118 – 132.

Site web : www.djelfa.info

Annexes

Annexe 01 : Composition des milieux de culture utilisés.

- **Gélose Muller-Hinton :**

Infusion de viande	2,0 g/litre
Hydrolysate acide de caséine	17,5 g/litre
Amidon soluble	1,5 g/litre
Agar agar	17,0 g/litre
pH du milieu.....	7,3 ± 0,2

- **Bouillon Muller-Hinton :**

Hydrolysate acide de caséine	17,5 g/litre
Amidon.....	1,5 g/litre
Extrait de cœur en pâte.....	5,0 g/litre
pH final:	7,4 ± 0,2

- **Milieu Chapman :**

Peptone :.....	10,0 g/litre
Extrait de viande	1,0 g/litre
Chlorure de sodium :.....	75,0 g/litre
Mannitol :.....	10,0 g/litre
Rougedéphénol :.....	0,025 g/litre
Agar-Agar	15,0 g/litre
pH.....	7,4

- **Milieu Hektoen:**

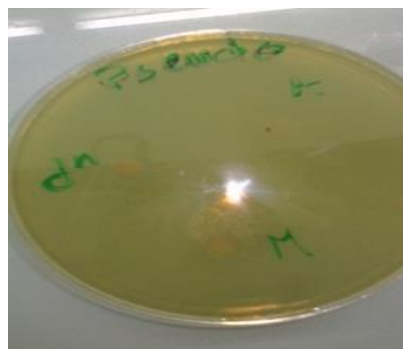
Peptone pepsique de viande.....	12,0 g/litre
Extrait autolytique de levure	3,0 g/litre
Lactose.....	12,0 g/litre
Saccharose	12,0 g/litre
Salicine.....	2,0 g/litre
Sels biliaires	9,0 g/litre
Chlorure de sodium	5,0 g/litre
Thiosulfate de sodium	5,0 g /litre
Citrate ferrique ammoniacal	1,5 g /litre

Bleu de bromothymol65 mg/litre
Fuchsine acide	40 mg/litre
Agar agar	13,5 g/litre
pH du milieu.....	7,6 ± 0,2

Annexe 02 : Résultats de l'aromatogramme.

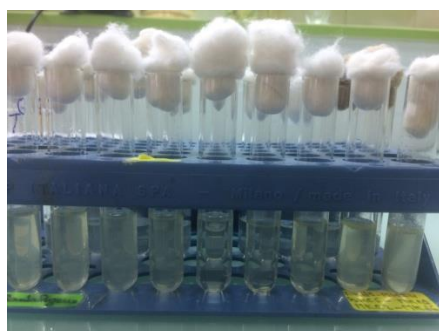


Aromatogramme des HEs du mois
D'Avril, Mai et Juin (*B. c*).

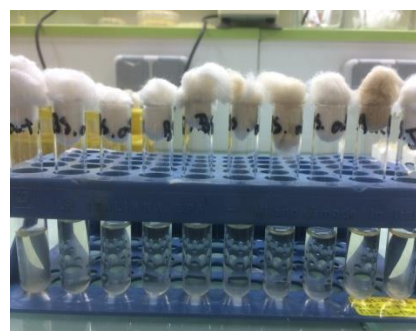


Aromatogramme des HEs du mois
d'Avril, Mai et Juin (*P. a*)

Annexe 03 : Résultats des CMI et CMB.

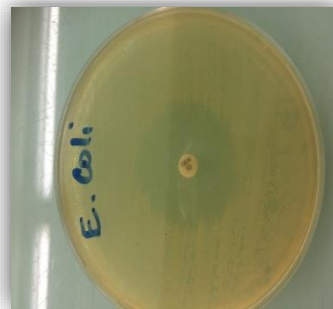


CMI de l'huile essentielle du mois
d'Avril avec (*E.c*).



CMI de l'huile essentielle du mois
d'Août avec (*B.s*).

Annexe 04: Résultats de l'antibiogramme.



Escherichia coli



Staphylococcus aureus

Pseudomonas aeruginosa



Bacillus cereus

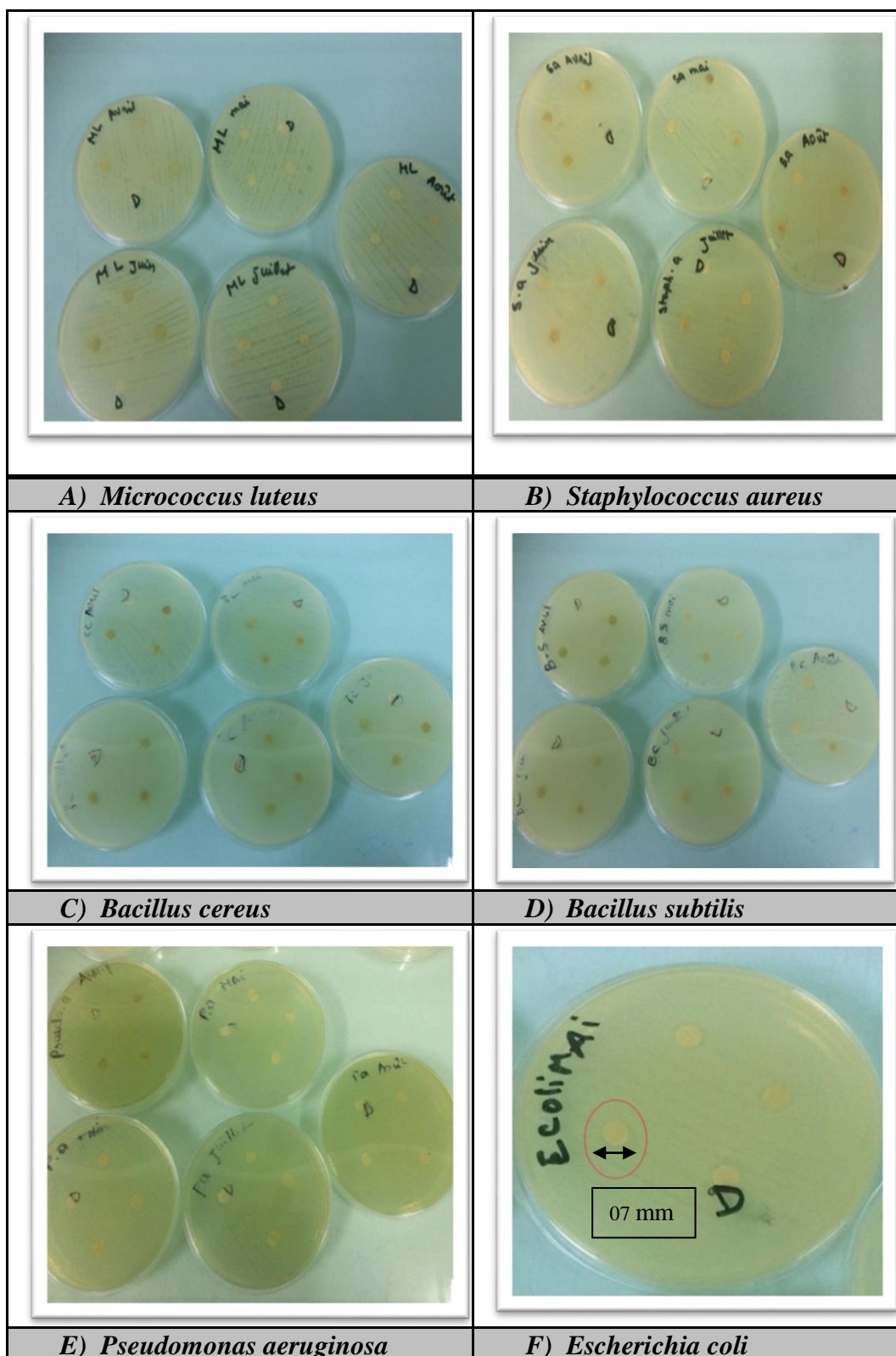
Bacillus subtilis

Annexe 05 : Résultats CMI et CMB de la Gentamycine (exemple de *Staphylococcus aureus*).



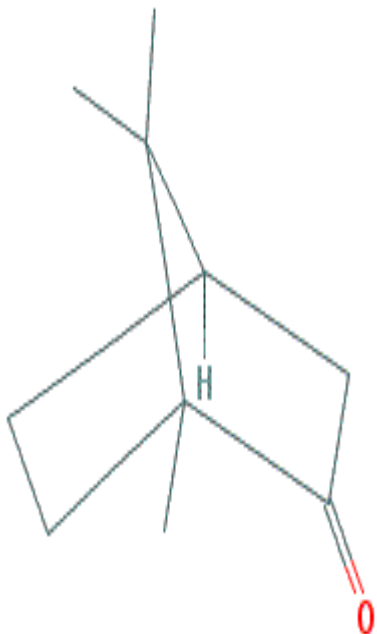
Détermination de la CMI de la Gentamycine avec la souche de *Staphylococcus aureus*.

Annexe 06 : L'effet des extraits phénoliques sur les différentes souches bactériennes utilisées.



Expression de l'activité des extraits phénolique d '*A. santolina* sur les différentes souches bactériennes testées (absence de l'halo d'inhibition).

Annexe 07 : Le camphre et le terpinène-4-ol.

Le camphre**Les propriétés du camphre**

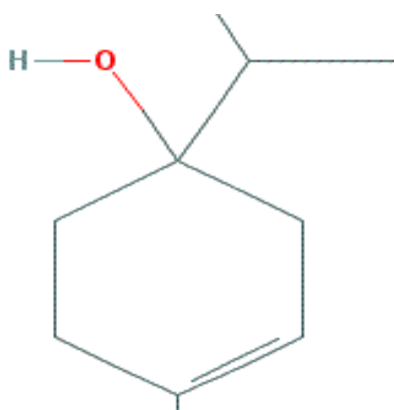
- Mucolytique
- Lipolytique
- Cholagogue
- Antibactérienne
- Antivirale
- Antifongique
- Parasiticide
- Cicatrisante
- Spasmolytique
- Sédatif
- Calmante
- Neurotrophe
- Circulatoire
- Cardiaque
- Respiratoire
- Anesthésiante locale
- Insectifuge
-

Carte d'identité du camphre

- Famille biochimique:
Cétones monoterpéniques
 - Formule brute : $C_{10}H_{16}O$
 - Synonyme : Bornéone
 - Autre dénomination: 1,7,7-triméthylbicyclo[2,2,1]heptan-2-one
 - Masse molaire : 152 g/mol
 - Température d'ébullition : 204°C
 - Point d'éclair : 66°C
-

Les propriétés du terpinène-4-ol

Le terpinène-4-ol



- Bactéricide
- Fongicide
- Virucide
- Immunomodulante
- Neurotonique ou sédative
- Spasmolytique
- Anti-inflammatoire
- Aquarédrique et diurétique

Carte d'identité du terpinène-4-ol

- Famille biochimique : alcools monoterpéniques
- Formule brute : C₁₀H₁₈O
- Synonymes : p-menth-1-en-4-ol, 1-isopropyl-4-méthyl-3-cyclohexèn-1-ol, 4-terpinéol, terpinéol-4
- Autre dénomination : 4-méthyl-1-(propan-2-yl)cyclohex-3-én-1-ol
- Masse molaire : 154,25 g/mol
- Température d'ébullition : 211 à 213°C
- Point d'éclair : 79°C

Annexe 08 : Formule de Kovats (Indice de rétention)

$$I_x^p = 100 Z + 100 \frac{T_{R(x)} - T_{R(z)}}{T_{R(z+1)} - T_{R(z)}}$$

I_x^p : Indice de rétention en programmation de température du composé X.

T_R(X): Température de rétention du composé X.

Z : Nombre d'atomes de carbone d'un alcane.

T_R (Z) : Température de rétention d'un alcane (Lourici, 2004).

Résumé

L'objectif de notre travail est l'étude de l'activité antibactérienne des extraits des huiles essentielles et polyphénoliques d'*Achillea santolina* L. (Asteraceae) récoltée dans la région d'EL-Bayadh durant les mois d'Avril, Mai, Juin, Juillet et Août 2017. Les rendements d'extraction obtenus pour les huiles essentielles et les extraits phénoliques varient entre 0.4-0.78% et 5.10-20.02%, respectivement. Les résultats de l'analyse chimique de la composition de l'huile d'*A. santolina* par chromatographie en phase gazeuse indiquent que le composant majoritaire est le camphre avec une fraction égale à 70,2%. L'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*A. santolina* a été évaluée par la méthode de diffusion sur gélose contre des souches de référence: il s'agit de *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*. *Pseudomonas aeruginosa* a été l'espèce la plus résistante, cependant, *Bacillus cereus* est montré la plus sensible aux huiles testées. L'efficacité de chaque huile essentielle a été estimée par la détermination de la CMI et CMB. Les résultats ont montré un effet bactéricide avec une forte activité exercée par l'huile du mois d'Avril. Les extraits phénoliques ne montrent aucune activité antibactérienne vis-à-vis les souches testées.

Mots clés : *Achillea santolina* L., huiles essentielles, polyphénols, activité antimicrobienne, CMI, CMB.

ملخص

هدفنا من هذا العمل هو دراسة فعالية مستخلصاتنا ضد البكتيريا سواء زيوت أساسية أو عديدات الفينول من نبتة العريعية *Achillea santolina* L. للعائلة النجمية مقتطفة من منطقة البيض خلال خمس أشهر متتالية، أفريل، ماي، جوان، جويلية وأوت 2017. مردودية استخلاص الزيوت الأساسية وعديدات الفينولات هي على التوالي محصورة بين 0.4-0.78% و 5.10-20.02%. كما أشارت التحاليل الكيميائية بكماتوغرافيا الطور الغازي لمكونات الزيوت الأساسية ان العنصر السائد هو الكافور بنسبة 70.2%. وتم تقييم فعالية الزيوت الأساسية لهذه النبتة بطريقة الانتشار على وسط صلب ضد السلالات التالية: *Micrococcus luteus*، *Bacillus subtilis*، *Staphylococcus aureus*، *Bacillus cereus* و *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa*. علما أن هذه الأخيرة هي السلالة الأكثر مقاومة في حين أن *Bacillus cereus* أظهرت أكثر تحسس للزيوت الأساسية المجربة. فعالية كل زيت قدرت بتحديد القيمة الدنيا للتثبيط والقيمة القصوى للقتل، وأظهرت النتائج تأثير قاتل للبكتيريا مع فاعلية قوية لزيت شهر أفريل. في حين أن مستخلصات الفينولات لم تظهر أية فاعلية ضد البكتيريا بالنسبة للسلالات المجربة.

الكلمات المفتاحية: العريعية، زيوت أساسية، عديدات الفينول، فاعلية ضد البكتيريا، القيمة الدنيا للتثبيط، القيمة القصوى للقتل البكتيري.

Abstract

The aim of this project is to study the antibacterial activity of extracts of essential oils and phenolic compounds from the aerial plant part of *Achillea santolina* (Asteraceae), harvested in the area of El-Bayadh during the period April-August 2017. Yields of the extracted essential oil and phenolic compounds were 0.4-0.78% and 5.10-20.02%, respectively. The GC analysis of essential oils has revealed the presence of camphor (70.2%), as dominant element. The antibacterial activity was tested by the method of disk diffusion against reference strains of *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Pseudomonas aeruginosa* was the most resistant strain. However, *Bacillus cereus* shows the most sensibility against essential oils. MIC and MBC of each oil were determinate. A bactericidal action against the tested strains was revealed and April essential oil showed the highest level of activity. In the other hand, phenolic compounds showed no antibacterial activity against the tested strains.

Keywords: *Achillea santolina* L., essential oils, phenolic compounds, antibacterial activity, MIC, CMB.