

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université Mouloud MAMMERY de Tizi-Ouzou

Faculté des sciences Biologiques et Agronomiques

Département de Biochimie-Microbiologie

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie

Option : Microbiologie Appliquée

Thème

**Etude préliminaire d'une plante médicinale saharienne
« *Pulicaria crista* » : phytochimie, activité antimicrobienne
et inhibitrice de biofilm.**

Réalisé par :

M^{elle} GADA Nadia.

M^{elle} OUSADOU Dyhia.

Soutenu le 04 juillet 2018

Présenté publiquement devant le juré composé de :

Mr. HOUALI K.

Professeur

Président.

Melle DERMECHE S.

M.A.A

Examinatrice.

Mme AFIF CHAOUICHE T.

M.C.B

Promotrice.

Promotion : 2017- 2018

Remerciements

Ce mémoire n'aurait pas pu être ce qu'il est sans l'aide de ALLAH qui nous a donné la force afin de l'accomplir.

Nous remercions vivement les membres de jury:

Le professeur HOUALI K,

On est très honorées que vous ayez accepté la présidence du jury de ce mémoire. Trouvez ici l'expression de nos sincères remerciements et soyez assuré de notre profonde gratitude.

Nous tenons à exprimer nos profonds remerciements et notre vive reconnaissance et considération à notre chère promotrice, le docteur AFIF CHAOUCHE T., qui a su, à sa façon, nous conseiller et nous orienter tout au long de la réalisation de ce travail.

Melle DERMECHE S.

Merci d'avoir accepté de faire partie du jury de ce mémoire et pour l'intérêt que vous portez à notre travail et pour le temps consacré afin de l'évaluer.

Un immense merci au personnel du laboratoire de microbiologie qui nous a été d'une grande aide durant la période de pratique.

Nos remerciements particuliers sont adressés au cadre pédagogique de nous avoir consacré de leur temps et nous avoir apporté de l'aide par leurs précieux conseils.

Que toute personne ayant participé de près ou de loin dans l'élaboration de ce travail, trouve ici l'expression de notre vive reconnaissance.

Dédicaces

On arrive enfin au terme de ce mémoire ;

Chers parents, c'est avec une énorme reconnaissance et une grande émotion que je vous dédie ce travail, vous êtes et vous serez à jamais ma plus grande fierté et la source de mon bonheur, que Dieu vous garde pour nous, je vous aime infiniment.

C'est avec grand plaisir que je dédie ce travail pour mes adorables frères, Lyes et Ghiles qui comptent énormément dans ma vie et qui sans eux, je ne serais pas ce que je suis devenue aujourd'hui.

Mes dédicaces s'orientent aussi vers ma belle sœur Nacera qui m'a été d'une grande aide et de bons conseils tout le long de ce travail.

Je ne pourrais pas oublier de citer mon petit ange, ma nièce Lyna, qui ne cesse d'illuminer notre quotidien.

A ma grande et adorable famille, oncles, tantes et spécialement cousins et cousines, avec tout mon amour envers vous.

Ce mémoire est dédié à ma chère cousine Samia qui a été là à chaque moment de la réalisation de ce travail.

Un énorme Merci pour l'une des personnes les plus chères à mon cœur, Youva GATER pour sa disponibilité, son soutien et ses précieux conseils.

Mes dédicaces vont spécialement à mon adorable binôme qui, au fil du temps, est devenue une sœur, et grâce à qui ces durs mois de travail ne ressemblaient qu'à de vrais moments de plaisir et de partage. Je te suis reconnaissante pour l'effort que tu as fourni pour la réalisation de ce travail. Je tiens aussi à adresser un grand merci pour ses sœurs Meriem et Sonia ainsi qu'à ses adorables parents pour leur gentillesse et leur aimable accueil.

Enfin, je dédie ce mémoire à chacun qui a participé à sa réalisation de pré ou de loin, merci à tous.

Nadia GADA

Dédicaces

Chers parents ; c'est a vous que j'ai l'immense plaisir de dédier ce présent travail, sachez que toutes les expressions du monde ne pourront jamais exprimer ma gratitude, mon merci et mon énorme reconnaissance, de toute foie ; je pris le grand Dieu de vous bénir, de vous offrir les meilleurs récompenses, et de vous réserver place en son vaste paradis... Amène.

Je dédie aussi ce travail à mon très aimable grand frère Latamene et mes très chères sœur Meriem et Sonia, je vous remercie pour tous les inoubliables moments chaleureux et solidaires que vous avez su établir entre nous, et pour cette occasion, je tiens a vous dire que je vous aime énormément.

Mes dédicaces s'orientent aussi vers ma grande famille paternelle et maternelle, et aussi vers ma belle famille et spécialement mon fiancé Belaid.

Je le dédie également, à mon très cher binôme Nadia, qui a toujours été à mes côtés, qui a toujours su m'épauler dans les moments les plus difficiles que j'ai confronté durant ce travail, Je tiens également a remercié ses parents qui m'ont toujours accueillis très chaleureusement, ses frères, sa belle sœur et son adorable nièce Lina que j'aime énormément

Je le dédie aussi spécialement à mon fidèle amie d'enfance Saliha qui compte énormément pour moi, et que j'aime tellement.

Dyhia OUSADOU

Liste des abréviations	I
Liste des figures	III
Liste des tableaux	V
Introduction	1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Généralités, maladies infectieuses et multi résistances bactérienne

I. Agents responsables de maladies infectieuses	2
1. Bactéries	2
2. Champignons	3
3. Biofilms	3
3.1. Etapes de formation d'un biofilm	4
II. Maladies infectieuses	4
1. Modes de transmission des maladies infectieuses	4
1.1. Infections communautaires	4
1.1.1. Transmission par contacte directe	4
1.1.1.1. Transmission interhumaine	4
1.1.1.2. Auto-infection	5
1.1.1.3. Infection animal-humain	5
1.1.2. Transmission par contact indirect	5
1.2. Transmission des infections nosocomiales	5
1.2.1. Transmission endogène	5
1.2.2. Transmission exogène	5
1.2.2.1. Hétéro-infection	5
1.2.2.2. Xéno-infection	6
III. Resistance et multi-résistance bactérienne	6
1. Résistance naturelle	6
2. Résistance acquise	6
3. Résistance croisée	6
4. Co-résistance	6

CHAPITRE II : généralités sur les polyphénols et les huiles essentielles

1. Les polyphenols	8
---------------------------------	---

1.2. Classification des polyphénols	8
1.2.1. Formes les plus simples	8
1.2.1.1. Acide phénolique	8
1.2.1.1.1. Dérivés de l'acide hydroxybenzoïque	9
1.2.1.1.2-Dérivés de l'acide hydroxycinnamique	9
1.2.1.2. Ensembles des flavonoïdes	10
1.2.1.3. Alcool phénolique	10
1.2.2. Polyphénols complexes	11
1.2.2.1. Tanins hydrolysables	11
1.2.2.2. Tanins condensés	11
1.3. Extraction des polyphénols	12
1.3.1. Extraction à froid ou macération	12
1.3.2. Extraction à chaud ou décantation	12
1.4. Polyphénols et santé	12
1.4.1. Polyphenols et maladies infectieuses	12
2. Huiles essentielles	13
2.1. Histoire et importance	13
2.2. Procédés d'extraction des huiles essentielles	14
2.2.1. La distillation par entrainement à la vapeur	14
2.2.2. L'hydrodistillation (distillation à l'eau)	15
2.2.3. L'hydrodiffusion (percolation)	16
2.2.4. L'expression à froid	16
2.2.5. Extraction par solvants organiques	16
2.2.6. Extraction par enfleurage	16
2.2.7. L'hydrodistillation assistée par micro-ondes	16
2.2.8. L'hydrodistillation assistée par ultrasons	17
2.2.9. Extraction au dioxyde de carbone supercritique	17
2.3. Répartition et localisation des HEs	18
2.4. Composition chimique des HEs	18
2.5. Activités biologiques des HEs	19
2.5.1. Activité antibactérienne	19
2.5.2. Activité antifongique	19

Chapitre III : Généralités sur la plante *Pulicaria crispa*

1. Appellations	20
2. Classification	20
3. Description	20
4. Origine et répartition géographique	21
5. Utilisations et propriétés thérapeutiques	21
6. Composition chimique	22
7. Généralités sur le climat saharien.....	22
7.1. Caractéristiques floristiques	23
7.1.1. Les plantes éphémères.....	23
7.1.2. Les plantes vivaces.....	23

PARTIE EXPERIMENTALE

Matériel et méthodes

I-Matériel

I.1. Matériel biologique	25
I.1.1. La plante	25
I.1.2. Souches microbiennes	25
I.2. Matériel non biologique.....	26
1.2.1. Milieux de culture utilisés	26
I.2.2. Solvants utilisés	27
I.2.3. Réactifs utilisés	27
I.2.4. Antibiotiques	27
I.2.5. Appareils	28
I.2.6. Verrerie et autre matériel	28

II. Méthodes

1. Récolte, séchage et broyage	29
2. Screening phytochimique	30
2.1. Préparation de l'infusé	30
3. Extraction des polyphénols	31
4. Rendement des polyphénols.....	32
5. Quantification des polyphénols totaux	32
5.1. Réalisation de la gamme étalon.....	33

6. Extraction de l'huile essentielle	34
7. Rendement de l'huile essentielle	36
8 .Activités biologiques.....	36
8.1. Activité antibactérienne.....	36
8.1.1. Préparation de <i>l'inoculum</i> bactérien.....	36
8.1.2. Antibiogramme.....	36
8.1.3. Etude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits	37
8.1.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice	38
8.2. Activité antifongique.....	38
8.3. Activité anti biofilm	39
8.3.1. Evaluation de la formation du biofilm par La méthode de tube (TM)	39
8.3.2. Test de l'effet antibiofilm.....	40

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Screening phytochimique	42
2. Extraction des polyphenols	43
3. Dosage des polyphénols	44
4. Rendement de l'huile essentielle.....	46
5. Résultats des antibiogrammes	46
6. Activités biologiques de <i>Pulicria crista</i>	56
6.1. Activité antibactérienne.....	56
6.1.1. Concentration minimale inhibitrice.....	61
6.2. Activité antifongique.....	62
6.3. Activité antibiofilm	64

Conclusion et perspectives	67
---	----

Références bibliographiques	69
--	----

Annexes

Liste des abréviations

ATB : Antibiotique.

BHIB : Bouillon cœur cervelle.

BLSE : β -lactamases à spectre élargi.

CMI : Concentration minimale inhibitrice.

DMSO : Diméthylsulfoxyde.

DO : Densité optique.

GN : Gélose nutritive.

I : Intermédiaire.

MH : Muller hinton.

MST : Maladies sexuellement transmissibles.

PBS : Tampon phosphate salin.

PDA : Gélose dextrosée à la pomme de terre.

R : Résistance.

S : Sensibilité.

SM : Solution mère.

TSB : Bouillon tryptone soja.

UFC : Unité formant colonies.

VIH : Virus d'immunodéficience humain.

Liste des figures

Figure 1 : Représentation des principales bactéries impliquées dans les maladies infectieuses	2
Figure 2 : Etapes de formation du biofilm.	4
Figure 3 : Structure du noyau phénol.	8
Figure 4 : Structures chimiques des acides hydroxybenzoïques.	9
Figure 5 : Structures chimiques des acides hydroxycinnamiques.	9
Figure 6 : Squelette de base des flavonoïdes.	10
Figure 7 : Structures de l'hydroxytyrosol et du tyrosol.	11
Figure 8 : Structure chimique d'un tanin condensé (proanthocyanidine) et d'un gallotanin (1,2,3-tri-O-galloyl- β -D-glucose).	11
Figure 9 : Illustration du procédé de la distillation par entraînement à la vapeur.	15
Figure 10 : Schématisation du procédé de l'hydrodistillation.	15
Figure 11 : Illustration du mécanisme de l'extraction par micro-ondes.	17
Figure 12 : Localisation des huiles essentielles.	18
Figure 13 : Macrographie de <i>Pulicaria crispa</i>	21
Figure 14 : Photo de la plante <i>Pulicaria crispa</i>	21
Figure 15 : Distribution de <i>Pulicaria crispa</i> en Afrique du nord et au moyen orientale.	21
Figure 16 : Répartition saisonnière du taux de présence des espèces éphémères	23
Figure 17 : Lieu de récolte de la plante.	25
Figure 18 : aspect de la poudre obtenue après broyage de la plante	29
Figure 19 : Différentes étapes de l'extraction des polyphénols.	31
Figure 20 : Dilutions des extraits brutes (solide/liquide).	33
Figure 21 : Dilutions de l'extrait solide.	33
Figure 22 : Dilutions de l'extrait liquide.	33
Figure 23 : Gamme étalon d'acide gallique.	23
Figure 24 : Extracteur des huiles essentielles par entraînement à la vapeur.	35
Figure 25 : Etapes de réalisation de l'activité antibactérienne.	38
Figure 26 : Explication du protocole du test de l'activité antibiofilm.	40
Figure 27 : Illustration des résultats du screening phytochimique.	42
Figure 28 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.	45
Figure 29 : Pourcentages de résistance, intermédiaire et de sensibilité des <i>Klebsiella pneumoniae</i> aux antibiotiques utilisés.	48

Figure 30 : Pourcentage de résistance, intermédiaire et sensibilité des souches de <i>Escherichia coli</i> aux antibiotiques testés.	48
Figure 31 : Résultats des tests antibiogrammes des Entérobactéries.	51
Figure 32 : pourcentage de résistance, intermédiaire et de sensibilité de <i>Staphylococcus aureus</i> aux antibiotiques testés.	53
Figure 33 : Résultats des tests antibiogrammes des Staphylocoques.	54
Figure 34 : Résultat du test antibiogramme de <i>Pseudomonas</i>	55
Figure 35 : Résultats du test de la phase solide (cai), de la phase solide (Ext) et de l'huile essentielle (Huile).	58
Figure 36 : Effet inhibiteur des différents extraits sur les souches de référence.	59
Figure 37 : Evolution de la moisissure en présence et en absence de l'extrait.	63
Figures 38 : Test de l'activité de l'extrait sur <i>Aspergillus niger</i>	64
Figure 39 : Test montrant la formation de biofilm par les souches <i>K.pneumonia</i> (1), <i>K.pneumoniae</i> (3) et <i>S. aureus</i> 25923.	65
Figure 40 : Résultat de la coloration au violet de Gentiane.	65

Liste des tableaux

Tableau 1 : Souches de références utilisées.	26
Tableau 2 : Origine des souches cliniques.	26
Tableau 3 : Protocole du screening phytochimique.	30
Tableau 4 : Mode opératoire du dosage des extraits bruts et de l'étalon.	32
Tableau 5 : Méthodologie des dilutions de l'étalon (acide gallique)	34
Tableau 6 : Résultats du screening phytochimique.	42
Tableau 7 : Do de la phase solide et liquide.	44
Tableau 8 : Densités optiques de la gamme étalon réalisée à partir de l'acide gallique.	45
Tableau 9 : Antibiogramme des Entérobactéries exprimé par le diamètre d'inhibition en millimètre.	47
Tableau 10 : Antibiogrammes des souches de <i>staphylococcus aureus</i> exprimé par le diamètre d'inhibition en millimètre.	52
Tableau 11 : Antibiogramme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> exprimé par le diamètre d'inhibition en millimètre.	55
Tableau 12 : Résultats de l'activité antibactérienne des extraits de <i>Pulicaria crista</i>	56
Tableau 13 : Résultats des tests des extraits sur les souches étudiées.	61
Tableau 14 : Diamètres des zones d'évolution d' <i>Aspergillus niger</i> en présence et en absence du 2ème extrait méthanolique.	62
Tableau 15 : DO de la plaque Elisa à 590 nm.	66

Introduction

Plusieurs questions se soulèvent à propos de l'efficacité et la sécurité des produits chimiques, pharmaceutiques destinés à la protection de la santé publique. En effet, le développement continu de la résistance bactérienne aux antibiotiques, due à la prescription abusive de ces derniers, préoccupe les spécialistes en médecine.

Les maladies infectieuses sont causées par tout type de germes infectieux ; bactéries, champignons, mais aussi par des complexes de bactéries (biofilms). L'un des dangers de ces pathologies réside en la multitude des formes de leur transmission, mais plus important aussi, la perpétuelle évolution de la résistance des germes causaux aux antibiotiques qui, normalement, les éradiquent.

L'identification et le développement de nouvelles molécules thérapeutiques s'avèrent indispensables afin de lutter contre ce phénomène de résistance bactérienne aux antibiotiques. Dans ce but, l'investigation des plantes représente un potentiel inestimable pour la découverte de nouvelles molécules à effet antimicrobien.

Notre étude s'est penchée vers l'exploration d'une plante issue du Sahara Algérien, et plus précisément du Hoggar, Tamanrasset « *Pulicaria crispa* », de la famille des Asteraceae, afin d'identifier et de tester ses substances antimicrobiennes intéressantes rapportées par la littérature.

Chimiquement, cette plante n'est pas homogène, puisqu'elle contient des monoterpènes, sesquiterpènes, flavonoïdes, des tanins...etc. ces molécules sont d'ailleurs la source de son effet inhibiteur contre les microorganismes (QAID M AL-HAJJ *et al.*, 2014).

Dans ce travail, on tâchera de caractériser les composants de cette plante, les doser et de mettre en évidence l'effet antimicrobien de son extrait phénolique et de son huile essentielle à l'encontre de souches de référence multiresistantes ainsi que sur des souches cliniques issues de différents prélèvements.

Afin d'élaborer ce travail, on a suivi les étapes suivantes :

- Introduction.
- Matériels et méthodes.
- Résultats et discussion.
- Conclusion et perspectives.

Synthèse
bibliographique

Les maladies infectieuses sont perçues comme de sérieuses menaces pour la santé des populations. Malgré les progrès scientifiques des dernières décennies, ces maladies restent encore des facteurs de risque graves et mortels pouvant justifier des craintes dans les sociétés.

La résistance bactérienne aux antibiotiques est apparue rapidement après leur introduction dans le traitement des maladies infectieuses. Cette résistance est un facteur majeur compliquant l'antibiothérapie, le contrôle des maladies infectieuses et de la dissémination de souches multi résistantes.

L'acquisition de la multi résistance aux antibiotiques par certaines bactéries, conduit dans quelques cas à des impasses thérapeutiques critiques.

I. Agents responsables de maladies infectieuses

1. Bactéries

Ce sont des êtres vivants unicellulaires, microscopiques, procaryotes et ubiquitaires, vivant individuellement ou en communautés complexes (biofilms) (O'TOOLE *et al.*, 2000). Les bactéries présentent des formes variées : coques, bacilles, spirales, incurvées, on les trouve isolées, en chainettes, en tétrades, en grappes...etc.

Il a été calculé que 10^{36} bactéries colonisent le corps humain, ce qui fait qu'il y a dix fois plus de cellules bactériennes que de cellules humaines dans le corps humain (TODAR, 2018). La plupart de ces bactéries sont inoffensives ou bénéfiques pour l'organisme, cependant, certaines peuvent devenir saprophytes et causer des pathologies plus ou moins dangereuses.

De nombreuses espèces bactériennes sont à l'origine de nombreuses maladies infectieuses comme le choléra, la syphilis, la peste, l'anthrax, la tuberculose, pneumonies...etc.

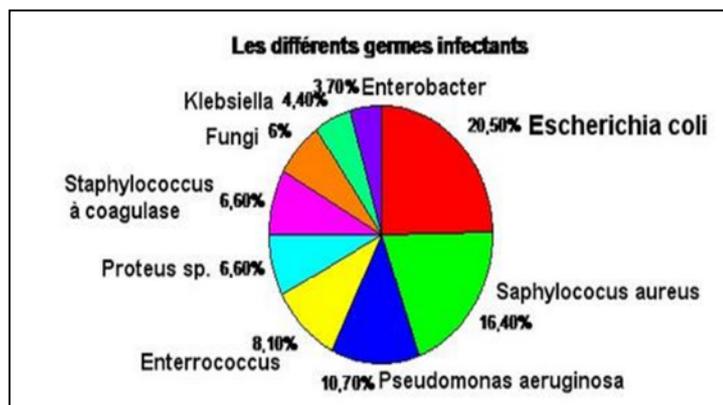


Figure1 : Représentation des principales bactéries impliquées dans les maladies infectieuses (BOTTEREL *et al.*, 2004).

Dans ce présent travail, on s'intéresse spécifiquement aux germes suivant : (voir annexe 2)

- *Escherichia coli*
- *Staphylococcus aureus*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Enterococcus faecalis*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Bacillus cereus*.

2. Champignons

Les champignons sont des organismes eucaryotes uni ou pluricellulaires, dépourvus de chlorophylle, ils sont constitués d'un thalle unicellulaire (comme pour certaines levures) ou pluricellulaire (mycélium) comme la plupart des micromycètes ou des macromycètes. C'est le thalle ou le filament mycélien qui assure la nutrition, celle-ci se fait par absorption et non par phagocytose. Les champignons sont des organismes hétérotrophes, vivant principalement en saprophyte aux dépens de matières organiques en décomposition (LYATIM, 2008). Ce sont des microorganismes appartenant au domaine des Eukarya et se divisent en levures et moisissures. Dans ce mémoire, on se focalise notamment sur :

- Candida albicans*
- Aspergillus niger* (voir annexe 2).

3. Biofilms

Les maladies infectieuses ne sont pas causées seulement par des bactéries ou champignons isolées, mais aussi par des germes vivant en communautés, c'est le biofilm. La formation d'un biofilm représente un changement radical de mode de vie des micro-organismes qui le constituent. Le passage d'un mode de vie planctonique, individuel, à un mode de vie communautaire et sessile, est un processus dynamique et complexe. Il est caractérisé par une modification de l'expression génétique et par un changement de phénotypes des micro-organismes concernés (GRASTEAU, 2011).

On peut définir trois propriétés communes à tous les biofilms (GOLLER et ROMEO, 2008).

- Les cellules constituant le biofilm sont reliées entre elles par une matrice extracellulaire composée de polysaccharides, de protéines et d'acides nucléiques.

- Le développement d'un biofilm est sous l'influence de signaux extracellulaires (environnementaux) et cellulaires (notion de quorum sensing).
- Le biofilm protège les bactéries qui le constituent de l'action des agents antimicrobiens, des défenses immunitaires de l'hôte et d'éventuels prédateurs.

3.1. Etapes de formation d'un biofilm

En général, les *Pseudomonas* font partie des microorganismes les plus souvent utilisés pour démontrer les 5 étapes de formation du biofilm comme schématisé ci-dessous :

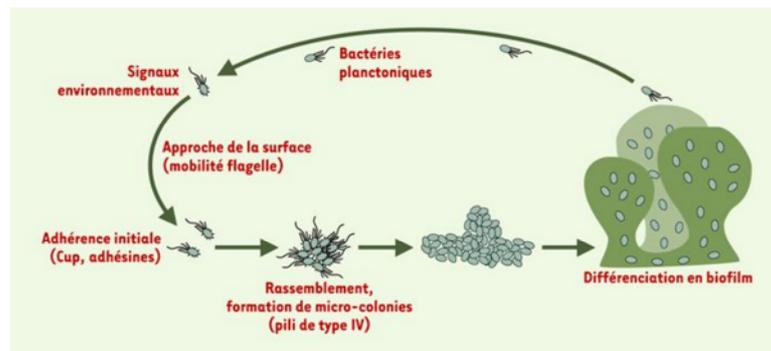


Figure 2 : Etapes de formation du biofilm.

(<https://ca.wikipedia.org>)

II. Maladies infectieuses

Les maladies infectieuses (MI) regroupent toutes les maladies provoquées par un agent infectieux animé (bactéries, virus, parasites, champignons) ou inanimé (toxines, prions,...), qui peuvent être à l'origine d'infections ou de toxi-infections. Leurs niveaux de contagiosité et leurs modes de transmission diffèrent selon la nature de l'agent infectieux (WAINSTEN, 2009).

1. Modes de transmission des maladies infectieuses

1.1. Infections communautaires

1.1.1. Transmission par contact direct

Se fait du malade vers l'hôte susceptible sans intermédiaire, on a différentes catégories :

1.1.1.1. Transmission interhumaine

Par contact physique, exp : grippe, rhume, infection bactérienne, MST... ou transmission verticale mère-enfant, exp : VIH, syphilis. (MEHDI, 2008).

1.1.1.2. Auto-infection

On parle aussi d'infections endogènes lorsque la flore normale du corps devient opportuniste, généralement chez les sujets immunodéprimés, exp : *E. coli*, bactéries commensales du colon, souvent impliquées dans les infections urinaires, plaies...etc.

(MEHDI, 2008).

1.1.1.3. Infection animal-humain

On parle ici de zoonoses, l'infection se fait soit par contact direct ou bien ses sécrétions, ses poils, ses plumes... soit par ingestion de produits provenant d'animaux infectés.

(MEHDI, 2008).

1.1.2. Transmission par contact indirect

Lorsque la transmission d'un agent pathogène à lieu via un vecteur. Il peut s'agir de n'importe quel objet où on peut y trouver des agents pathogènes à sa surface, comme ça peut être une transmission mécanique (l'animal ou l'insecte jouent le rôle de vecteurs et transportent le microorganisme pathogène sans le transformer) ou biologique (le vecteur joue un rôle essentiel dans le développement morphologique et physiologique du microorganisme, du coup, la transmission se fait uniquement lors de piqûres ou de morsures. Sans ce cycle, l'agent pathogène transporté n'est pas infectieux).

1.2. Transmission des infections nosocomiales

On parle d'infection nosocomiale si l'infection se déclare au moins 48 heures après l'admission d'un patient en hospitalisation, ou plus tard, si la période d'incubation est connue et est plus longue, et elle est repoussée 1 an, si le patient a reçu une prothèse ou un implant. (STEPHANIE, 2009)

1.2.1. Transmission endogène

Dans ce cas le malade s'infecte lui-même avec ses propres germes, généralement suite à des lésions des muqueuses ou des lésions cutanées. Les germes proviennent de la flore commensale. (STEPHANIE, 2009)

1.2.2. Transmission exogène

1.2.2.1. Hétéro-infection

Si l'agent responsable de l'infection provient d'un autre malade et peut provoquer ce qu'on appelle une infection croisée. (STEPHANIE, 2009)

1.2.2.2. Xéno-infection

Dans le cas où l'agent pathogène est transmis depuis l'extérieur du milieu hospitalier, véhiculé par le personnel soignant ou par le visiteur. (STEPHANIE, 2009)

III. Résistance et multi-résistance bactérienne

On peut dire qu'une souche est résistante lorsqu'elle est capable de supporter une concentration d'antibiotiques beaucoup plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce (AGUILERA-CARBO *et al.*, 2008).

1. Résistance naturelle

La résistance naturelle ou résistance intrinsèque est une caractéristique propre à une espèce bactérienne et partagée par toutes les souches de cette espèce. Elle peut être due à la présence d'un gène chromosomique commun à toutes les bactéries de l'espèce. Pour chaque classe d'antibiotique, il existe des espèces bactériennes pour lesquelles l'antibiotique est inactif par défaut de cible ou d'accès à la cible. Ainsi, l'absence de paroi chez les mycoplasmes rend les β -lactamines inactives vis à vis de ces bactéries (MEHDI, 2008).

2. Résistance acquise

La résistance bactérienne acquise à un antibiotique est un phénomène qui apparaît au niveau des souches d'une espèce donnée, normalement sensible à cet antibiotique. C'est l'acquisition d'un facteur génétique qui se traduit par une réduction de la sensibilité à la molécule qui lui était fatale. Elle peut donc se faire soit par mutation chromosomique soit par acquisition des gènes transférés d'un autre micro-organisme (MEHDI, 2008).

3. Résistance croisée

La résistance croisée est un phénomène par lequel une bactérie qui a développé une résistance à l'un des antibiotiques d'une classe devient aussi résistante aux autres membres de la même classe. Cela même si elle n'a jamais été exposée à ces molécules. C'est cette résistance croisée qui permet aux β -lactamases à spectre étendu (BLSE) présentes chez les bactéries à Gram négatifs d'avoir une résistance si étendue (β -lactamines et céphalosporines) à tel point qu'elles deviennent un véritable enjeu en santé humaine (JULIE, 2014).

4. Co-résistance

Plusieurs mécanismes de résistance sont associés chez la même bactérie, parfois stabilisés par intégration dans le chromosome. Chacun des mécanismes confère par résistance croisée la résistance à un groupe d'antibiotique conférant à la bactérie un large spectre de résistance (STEPHANIE, 2009).

1. Les polyphénols

Les polyphénols, dénommés aussi composés phénoliques, sont des molécules spécifiques du règne végétale et qui appartiennent à leur métabolisme secondaire. (ACHAT, 2013), (HE *et al.*, 2008).

On les trouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits (RICHTER G. 1993) leur répartition qualitative et quantitative est inégale selon les espèces, les organes, les tissus et les stades physiologiques (PASCAL *et al.*, 2006).

Le terme phénol englobe approximativement 10 000 composés naturels identifiés (DRUZYNKKA *et al.*, 2007), l'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau phénolique à 6 carbones (figure 3) auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle (OH) libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester ou hétéroside (BALASUNDRAM *et al.*, 2006).

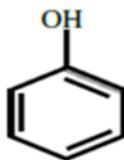


Figure 3: Structure du noyau phénol.

(SARNI-MANCHADO et CHEYNIER, 2006).

Les composés phénoliques sont en effet des éléments importants des qualités sensorielles (odeur, astringence...) et nutritionnelles des végétaux que consomme l'Homme, et leur intervention dans la santé est maintenant reconnue dans des domaines variés. (SARNI-MANCHADO et CHEYNIER, 2006)

1.2. Classification des polyphénols

Elle est basée essentiellement sur la structure, le nombre de noyaux aromatiques et les éléments structuraux qui lient ces noyaux. On peut distinguer deux catégories : les composés phénoliques simples et les composés phénoliques complexes (GUIGNARD, 2000), (D'ARCHIVIO *et al.*, 2007)

1.2.1. Formes les plus simples

1.2.1.1. Acidephénolique

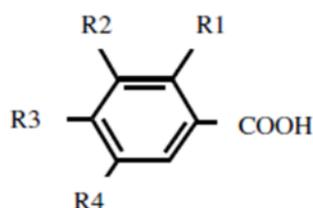
Ce sont des composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un

hydroxyle phénolique, ils sont représentés par deux sous classes : dérivés de l'acide hydroxybenzoïque et de l'acide hydroxycinnamique (BRUNETON, 2008).

1.2.1.1.1. Dérivés de l'acide hydroxybenzoïque

Ils sont dérivés de l'acide benzoïque est ont une formule de base de type (C₆-C₁) (PASCAL *et al.*, 2006).

Cette catégorie est abondante dans les végétaux et les aliments, notamment les épices, les fraises, certains fruits rouges et l'oignon, dans lesquels les concentrations peuvent atteindre plusieurs dizaines de milligrammes par kilogramme de fruit frais. (MANACH *et al.*, 2004).

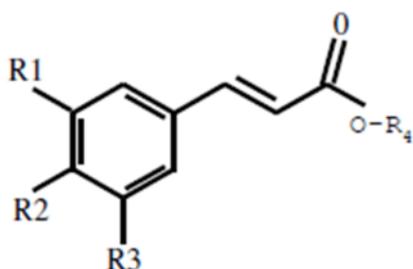


R ₁ =R ₂ =R ₃ =R ₄ =H	acide benzoïque (non phénolique)
R ₁ = R ₂ = R ₄ =H , R ₃ =OH	acide p-hydroxybenzoïque
R ₁ = R ₄ =H, R ₂ = R ₃ =OH	acide protocatéchique
R ₁ =R ₄ =H, R ₂ =OCH ₃ , R ₃ =OH	acide vanillique
R ₁ =H, R ₂ = R ₃ = R ₄ = OH	acide gallique
R ₁ =H, R ₂ = R ₄ =OCH ₃ , R ₃ =OH	acide syringique
R ₁ =OH, R ₂ =R ₃ =R ₄ =H	acide salicylique
R ₁ =R ₄ =OH, R ₂ =R ₃ =H	acide gentisique

Figure 4 : Structures chimiques des acides hydroxybenzoïques (D'ARCHIVIO *et al.*, 2007)

1.2.1.1.2-Dérivés de l'acide hydroxycinnamique

Ils représentent une classe très importante dont la structure de base (C₆- C₃) dérive de celle de l'acide cinnamique.



R ₁ = R ₂ = R ₃ = R ₄ = H :	acide cinnamique (non phénolique)
R ₁ = R ₃ = R ₄ = H, R ₂ = OH :	acide p-coumarique
R ₁ = R ₂ = OH, R ₃ = R ₄ = H :	acide caféique
R ₁ = OCH ₃ , R ₂ = OH, R ₃ = R ₄ = H :	acide férulique
R ₁ = R ₃ = OCH ₃ , R ₂ = OH, R ₄ = H :	acide sinapique
R ₁ = R ₂ = OH, R ₃ = H, R ₄ =	acide quinique : acide chlorogénique

Figure 5 : Structures chimiques des acides hydroxycinnamiques (HONG *et al.*, 2007), (CHIRA *et al.*, 2008)

L'acide caféique est le principal représentant de cette catégorie, il à une répartition quasi universelle chez les végétaux (grain de café, olive, tomate, pomme) en particulier dans les fruits, principalement sous forme d'ester de l'acide quinique (acide chlorogénique), il

représente 75 à 100% de la teneur totale en hydroxycinnamique de la majorité des fruits. (MANACH, 2005)

1.2.1.2. Ensembles des flavonoïdes

Sont des composés possédant un squelette de structure générale en C_{15} ($C_6-C_3-C_6$) (figure 6) (GHEDIRA, 2005). Il comprend à lui seul plusieurs milliers de molécules regroupées en plus de dix classes constituées de deux noyaux aromatiques et d'un hétérocycle central de type pyrane.

Ce sont les composés les plus abondants parmi tous les composés phénoliques. Ils interviennent dans la pigmentation des fleurs et dans les processus de défenses contre les rayonnements UV, les herbivores et les défenses microbiennes (MICOL, 2005) les flavonoïdes sont présents dans une grande variété d'aliments (fruits et légumes, céréales, thé et vin...).

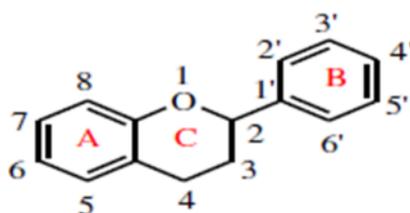


Figure 6 : Squelette de base des flavonoïdes. (CROZIER, 2003)

Il existe plusieurs classes de flavonoïdes dont les principales sont les flavones, les flavonols, les flavan-3-ols, les isoflavanes, les flavonones et les anthocyanidines. C'est la structure de l'hétérocycle central et son degré d'oxydation qui permettent de distinguer les différentes classes de flavonoïdes. (CHIRA *et al.*, 2008)

1.2.1.3. Alcool phénolique

Un alcool phénolique est un composé organique possédant au moins un alcool aliphatique et un hydroxy phénolique. Le tyrosol (4-hydroxyphenylethanol) et hydroxytyrosol (3,4-dihydroxyphenylethanol) (figure 7) sont les principales molécules de cette classe. Ces composés sont très abondants dans l'olive (fruit et feuille), libres ou associés à l'acide élénolique (MICOL *et al.*, 2005), (SILVA *et al.*, 2010). L'oleuropéine est le principal alcool phénolique de l'olive responsable de la l'amertume (Briante *et al.*, 2004)

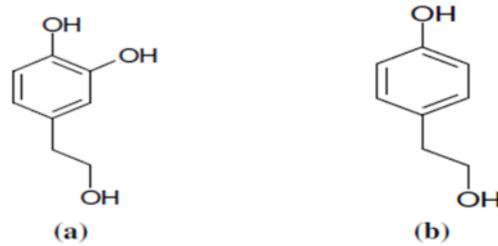


Figure 7 : Structures de l'hydroxytyrosol (a) et du tyrosol (b). (LONG *et al.*, 2010)

1.2.2. Polyphénols complexes

Ces composés résultent généralement de la condensation de certaines des formes simples (PASCAL *et al.*, 2006). Ils représentent une classe très importante de polyphénols localisés dans les vacuoles. (AGUILERA-CARBO *et al.*, 2008).

Le terme tanin regroupe des composés de polyphénols caractérisés par leurs propriétés de combinaison aux protéines (PARIS et HURABEILLEN, 1981), d'où leur capacité à tanner le cuir (LINDEN et LORIENT, 1994).

Sur le plan structural, les tanins sont divisés en deux :

1.2.2.1. Tanins hydrolysables

Ils sont caractérisés par le fait qu'ils peuvent être dégradés par hydrolyse chimique (alcaline ou acide) ou enzymatique (tannase) (PASCAL *et al.*, 2006). Ils libèrent alors une partie phénolique qui peut être soit de l'acide gallique, soit un dimère de ce même acide, l'acide ellagique, et une partie non phénolique.

1.2.2.2. Tanins condensés

En raison de leurs complexations avec protéines salivaires, les tanins condensés sont responsables de l'astringence caractéristique des fruits avant maturité (raisin, pêche, pomme, poire, etc...) et de certaines boissons (vin, cidre, thé, etc...) et de l'amertume du chocolat (PARIS et HURABEILLEN, 1981).

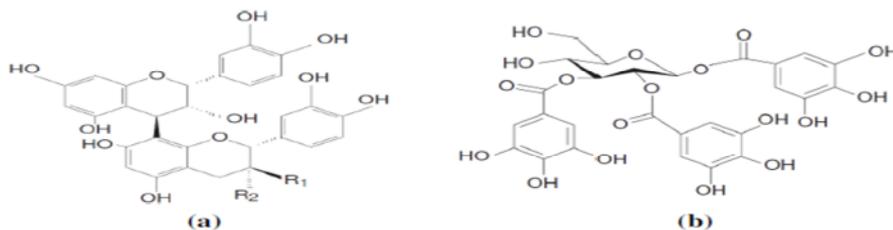


Figure 8 : Structure chimique (a) d'un tanin condensé (proanthocyanidine) et (b) d'un gallotanin (1,2,3-tri-O-galloyl- β -D-glucose). (D'ARCHIVIO *et al.*, 2007).

1.3. Extraction des polyphénols

L'extraction des principes actifs de la plante peut se faire par deux différents procédés :

1.3.1. Extraction à froid ou macération

La macération consiste à laisser la poudre de la matrice végétale en contact prolongé avec un solvant pour en extraire les principes actifs. C'est une extraction qui a l'avantage de préserver les substances thermosensibles, elle se déroule en 3 étapes : macération, filtration et concentration au rotavapeur .

1.3.2. Extraction à chaud

La décantation consiste à porter le mélange poudre solvant à ébullition au bain marie. Ce procédé présente l'avantage d'en extraire le maximum de principes actifs, mais les molécules thermolabiles risquent de se détériorer à cause de la chaleur. Cette technique se passe en ces étapes : ébullition, filtration et centrifugation (CHAVANE *et al.*, 2001).

1.4. Polyphénols et Santé

Beaucoup d'études ont mis en avant les avantages potentiels des polyphénols pour la santé. Des études épidémiologiques suggèrent que la consommation à long terme d'aliments riches en polyphénols, offrirait une protection pour limiter le développement de cancers, maladies cardiovasculaires, du diabète, des inflammations et d'autres pathologies. Ils agiraient en tant qu'antioxydants et ainsi protègeraient les cellules contre les dommages causés par les radicaux libres, qui contribuent aux lésions des tissus dans le corps.

Diverses études mettent en avant le fait que la peau mettrait plus de temps à avoir un coup de soleil, en consommant des polyphénols, suite à une exposition UVs (COWAN, 1999).

Les polyphénols ont également montré des effets protecteurs dans d'autres pathologies, telle que la sclérose en plaque (GONZALEZ-GALLEGO *et al.*, 2010), l'ostéoporose (SCALBERT *et al.*, 2005) et les pathologies liées au vieillissement cérébral (maladie d'Alzheimer, autres types de démences, maladie de Parkinson...) (SPENCER, 2010).

1.4.1. Polyphenols et maladies infectieuses

Les polyphénols 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 microbiennes, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire (COWAN, 1999).

2. Huiles essentielles

Afin de définir les huiles essentielles, il faut d'abord passer par la définition des "essences végétale" :

L'essence est élaborée dans les tissus de la plante aromatique via le processus de la photosynthèse.

Au fur et à mesure que s'élaborent les essences par le biais de cellules sécrétrices, elles sont stockées au sein des tissus des plantes aromatiques dans des micropoches.

Lorsque nous distillons ces plantes, la vapeur d'eau (ou n'importe quel procédé d'extraction) fait éclater les micropoches à essences et la part la plus volatile de celles-ci est extraite (HUETE, 2012).

L'huile essentielle donc est le résultat de la transformation de l'essence lors de la distillation d'une plante aromatique.

L'huile essentielle est un liquide de couleurs différentes (selon la plante), constituant des mélanges naturels, variables et complexes de métabolites secondaires volatiles, aromatiques et parfumantes (BENABDELKADER, 2012), elle est isolée par divers procédés physiques et mécaniques à partir de feuilles (lavande, citronnelle, romarin), de graines (muscade, aneth), de bourgeons, de fleurs (jasmin, rose), de brindilles, d'écorces (cannelier), de bois (santal), de racines (vétiver, angélique), de tiges (citronnelle), de fruits (bleuet, citron) des plantes aromatiques, mais également de gommes et des rhizomes (gingembre, acorus) (TOURE, 2015).

Les huiles essentielles ont des propriétés et des modes d'utilisation particuliers, et ont donné naissance à une nouvelle branche de la phytothérapie qui est « l'aromathérapie » (BENAYAD, 2008). De très nombreuses espèces végétales produisent des HEs, il en existe plus de 2000 espèces appartenant à environ 60 familles (BENABDELKADER, 2012).

Aujourd'hui les HEs sont omniprésentes, dans des domaines aussi divers que la parfumerie, la cosmétique, l'agroalimentaire mais aussi dans la recherche pharmaceutique (FERNANDEZ et CHEMAT, 2017).

2.1. Histoire et importance

Les huiles essentielles ont, à toute époque, occupé une place importante dans la vie

quotidienne de l'homme, qui les utilisait autant que pour se parfumer, aromatiser sa nourriture et particulièrement pour se soigner.

La connaissance des HEs remonte à fort longtemps, puisque l'homme préhistorique pratiquait déjà, à sa manière, l'extraction des principes odorants des plantes (PIOCHON, 2008).

L'utilisation des substances odorantes des plantes à été décrite à l'antiquité par les plus anciennes civilisations : tout d'abord dans l'Orient et le moyen Orient, puis le Nord Africain suivi de l'Europe (FRANCHOMME et PENOEL, 1990).

En suite, progressivement, dans l'histoire moderne, les HEs se font connaitre par leurs vertus thérapeutiques et deviennent alors des remèdes courants dans la médecine traditionnelle.

En 1928 le chimiste Français René Maurie Gattefosse a utilisé le terme « aromathérapie » pour décrire les propriétés curatives des huiles essentielles, lorsqu'il a découvert par accident que la lavande a guéri une brûlure à sa main (BENABDELKADER, 2012).

En 1964, le docteur Français Jean Valunet a connu a grand succès en traitant des patients en médecine et en psychiatrie avec des HEs. De nos jours, la médecine moderne utilise les composés volatils de ces huiles constituants comme ingrédients courants dans les préparations pharmaceutiques (PAULI, 2001).

2.2. Procédés d'extraction des huiles essentielles

L'huile essentielle représente de 0.1 à 3% du poids sec des plantes aromatiques (HASSIOTIS, 2010).

En connaissant l'ampleur des vertus de ces «essences végétales », les scientifiques s'efforcent de les extraire depuis la plus haute Antiquité, mais c'est que vers le 13^{ème} siècle, en Europe, plus précisément dans le sud de la France, que l'on a commencé à explorer divers méthodes d'extraction de ces produits volatils (FERNANDEZ et CHEMAT, 2017).

Connaissant mieux les constituants des HEs, des techniques se sont développées, visant à optimiser la qualité de l'huile tout en maintenant un rendement intéressant. On cite les procédés les plus courants :

2.2.1. La distillation par entrainement à la vapeur

C'est de loin le procédé le plus utilisé. Il consiste en une séparation des constituants

d'un mélange de deux ou plusieurs composants en fonction de leur température de passage à l'état gazeux, donc la production, dans ce cas, des HEs passe par deux étapes :

- La diffusion de l'huile de l'intérieur des tissus vers la surface du matériel végétal.
- Evaporation et entrainement de l'huile à la vapeur d'eau (MEBARKA, 2008).

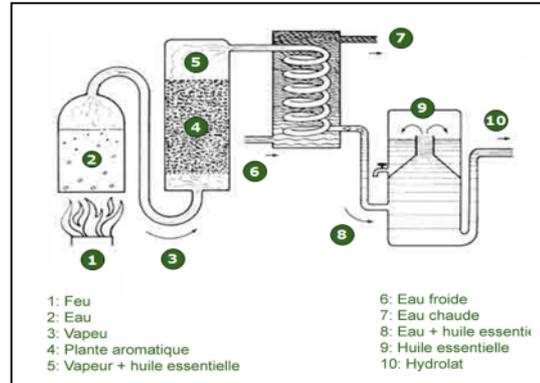


Figure 9 : Illustration du procédé de la distillation par entrainement à la vapeur.

2.2.1. L'hydrodistillation (distillation à l'eau)

Selon Bruneton (1999), cette technique consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter dans un alambic rempli d'eau et qui est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées dans un réfrigérant, l'HE se sépare de l'hydrolat par simple différence de densité.

Cette méthode présente plusieurs inconvénients : modification de la couleur, de l'odeur et de la composition des huiles (CHAICHAT *et al.*, 1997), ainsi qu'il se peut que des réactions d'hydrolyse, de réarrangement, d'oxydation et d'isomérisation se produisent, dénaturant ainsi les HEs (BRUNETON, 1999).

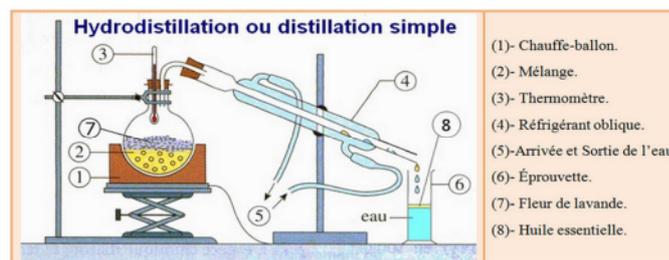


Figure 10 : Schématisation du procédé de l'hydrodistillation.

2.2.3. L'hydrodiffusion (percolation)

C'est une modification du processus de l'entraînement à la vapeur d'eau, au cours duquel la vapeur arrive par le haut d'un conteneur d'herbe lui permettant de percoler à travers la matière végétale par gravité (FRANCHOMME et PENOEL, 1990).

L'avantage de cette technique est traduit par l'amélioration qualitative et quantitative de l'huile récoltée, l'économie de temps, de vapeur et d'énergie (ROUX, 2008).

2.2.4.L'expression à froid

Le procédé s'applique qu'aux agrumes et consiste à briser les poches à essence des zestes frais pour en extraire les huiles (HUETE, 2012). Cette opération peut se faire à la main ou après scarification mécanique (BOUCARD et SERTH, 1998).

2.2.5.Extraction par solvants organiques

Cette technique consiste à faire passer des solvants à travers les plantes au moyen d'une basse température d'ébullition, afin de pouvoir extraire les substances aromatiques. Les solvants sont ensuite évaporés, isolant ainsi l'essence naturelle (HUETE, 2012).

L'inconvénient de ce procédé réside dans le coût cher des extracteurs et la haute consommation en solvants (BRIAN, 1995), ainsi que la présence de traces de ces derniers dans l'huile essentielle extraite.

2.2.6.Extraction par enfleurage

Réside à déposer des pétales de fleurs fraîches sur des plaques en verre recouvertes de minces couches de graisse animale, cette opération peut prendre 24 à 72h (selon les espèces). Les pétales sont éliminées et remplacées par d'autres jusqu'à saturation du corps gras (BELAICHE, 1979).

Ce dernier est ensuite épuisé par l'alcool absolu, ce solvant est évaporé sous vide pour ne laisser que les substances végétales (GUILLEMAN *et al.*, 1989). Afin d'accroître le rendement de production des huiles essentielles, d'autres techniques ont été développées, on cite :

2.2.7.L'hydrodistillation assistée par micro-ondes

Le matériel végétal est émergé dans un solvant transparent aux micro-ondes de manière à ce que seul le végétal soit chauffé. Les ondes chauffent donc l'eau présente dans le

système glandulaire et vasculaire de la plante, libérant ainsi les produits volatils qui passent dans le solvant, une filtration est ensuite réalisée (MEBARKA, 2008).

Le procédé est très rapide, peu consommateur d'énergie et livre un produit de qualité supérieure comparant à d'autres techniques (BRUNETON, 1999).

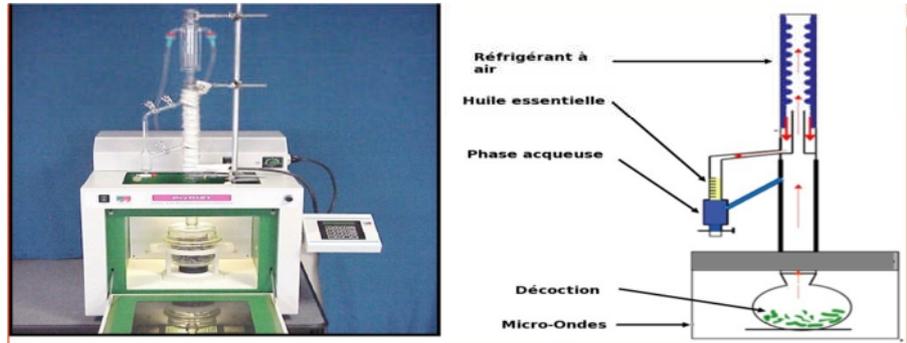


Figure 11 : Illustration du mécanisme de l'extraction par micro-ondes.

2.2.8.L'hydrodistillation assistée par ultrasons

Lorsque les ultrasons se propagent à travers un liquide, les oscillations des molécules provoquent la formation de zones de raréfaction, quand les cycles de raréfaction augmentent, les forces maintenant la cohésion du liquide sont vaincues et des bulles de cavitation apparaissent. Ces bulles vont imploser à la surface du végétal, provoquant la rupture des membranes des cellules qui libèrent leurs contenus à l'extérieur (DOLATOWSKI *et al.*, 2007) . Puisque les glandes comportant les HEs sont généralement présentes à la surface des plantes aromatiques, l'implosion détruit ces glandes qui libèrent l'huile dans le milieu environnant (VEILLE *et al.*, 2010). L'avantage essentiel de ce procédé est de réduire considérablement la durée de l'extraction, d'augmenter le rendement en extrait et de faciliter l'extraction des molécules thermosensibles (LAGUNEZ RIVERA, 2006).

2.2.9.Extraction au dioxyde de carbone supercritique

La masse végétale et le CO₂ sont soumis à une condition au-delà du point critique : T°=31.1°C et P > 73.8 bars. A cette condition le dioxyde de carbone atteint un état supercritique intermédiaire entre l'état gazeux et l'état liquide (HUETE, 2012).

Cette propriété confère au CO₂ un bon pouvoir extracteur ainsi qu'une facilité de modulation en jouant sur les conditions de température et de pression (PIOCHON, 2008).

Le CO₂ supercritique est un solvant idéal puisqu'il présente d'incorruptibles atouts : il est naturel, inerte chimiquement, ininflammable, non toxique, sélectif, aisément disponible et peu

couteux. De plus il s'élimine facilement de l'extrait sans laisser de résidus, ce qui donne une qualité irréprochable de l'extrait (BRUNETON, 1999).

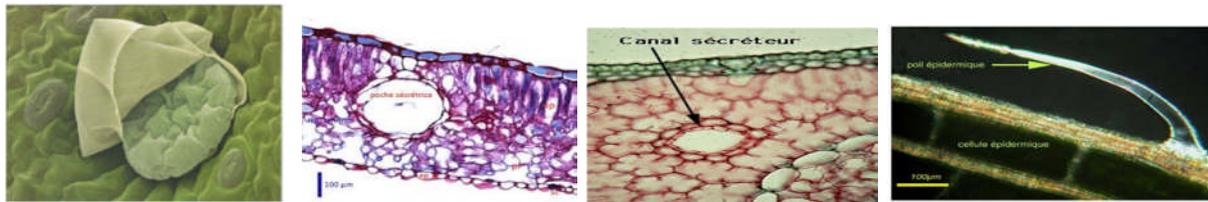
Le principal point faible de cette méthode est le coût élevé de son installation (PELERIN, 1991).

2.3. Répartition et localisation des HEs

Selon Bruneton (1999), les huiles essentielles n'existent que chez les végétaux supérieurs.

Les plantes capables d'élaborer les constituants qui composent les HEs (plantes aromatiques) sont réparties dans un nombre limité de familles, ex : Apiaceae, Asteraceae, Cupressaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Poaceae, Rutaceae, Piperaceae...ect (PARIS et HURABIELLE, 1981) (GHESTEM *et al.*, 2001).

Les structures aromatiques spécifiques spécialisées dans la sécrétion des composés aromatiques sont très diverses, on cite :



Glande sécrétrice

Poche sécrétrice

Canal sécréteur

Poil sécréteur

Figure 12 : Localisation des huiles essentielles.

2.4. Composition chimique des HEs

L'activité thérapeutique des huiles essentielles est étroitement liée à sa structure biochimique, aux groupes fonctionnels de ses composés principaux et à leurs activités synergiques (MAYER, 2012). Les constituants chimiques de ces huiles appartiennent, de façon quasi exclusive, à deux groupes distincts qui constituent les composés volatils :

- Térpénoïdes (composés terpéniques) : Monoterpènes ($C_{10}H_{16}$).
- Sésquiterpènes ($C_{15}H_{24}$).

On trouve également le groupe des composés aromatiques (volatils) ; dérivés du phénylpropane, qui sont beaucoup moins fréquents. Ce groupe de composés dérive majoritairement de la phénylalanine (KHENAKA, 2011) et comporte des composés constitués d'une chaîne carbonée liée à un noyau aromatique à six carbones (CALSAMIGLIA, 2007) .

Elles peuvent également renfermer divers autres produits issus du processus de dégradation, mettant en jeu des constituant, cette fois, non volatils (BRUNETON, 1999). Ce sont des produits résultant de la transformation de molécules non volatiles, ex : dégradation d'acides gras de terpènes (MEBARKA, 2008). On trouve également des composés azotés et soufrés (l'allylisothiocyanate).

2.5. Activités biologiques des HEs

La diversité moléculaire des métabolites que contiennent les huiles essentielles leur confère des rôles et des propriétés biologiques très intéressantes :

2.5.1. Activité antibactérienne

Quelques HEs ont manifesté des propriétés inhibitrices très remarquables, on cite celles de : clou de girofle, laurier, cannelle, thym, origan et de l'amande amer, ces espèces inhibent au moins vingt genres des bactéries testées (JANSSEN *et al.*, 1988). Les huiles de ces plantes ont une particularité commune, elles sont riches en composés phénoliques, comme : l'eugénol, le thymol et le carvacrol, possédant une forte activité antibactérienne (FABIAN *et al.*, 2006).

2.5.2. Activité antifongique

Les activités antifongiques de nombreuses huiles essentielles incluant celles du thym, de la citronnelle et de la cannelle ont été décrites (BURT, 2004).

On ajoute que 93.30% des levures testées par De Carvalho et Da Fonseca (2005), se sont montrées sensibles à l'HE de *Cordia verbenaceae*.

En plus de ces activités, on note également l'activité antiparasitaire (MAYER, 2012), l'activité antiseptique (WILLEM, 2002), l'activité antitumorale (MBAREK *et al.* 2007), l'activité anti inflammatoire (BEDI *et al.*, 2010), régulation du système nerveux (NAUCIEL et VILDE, 2005) et Activité antivirale.

La plante étudiée dans le présent travail est une plante saharienne de la région du Hoggar Algérien dans la wilaya de Tamanrasset.

1. Appellations

Nom latin : *Pulicaria crispa*.

Noms vernaculaires

Connue sous plusieurs noms vernaculaires en fonction des régions : « SEKBA » dans le sud Algérien (Hoggar, Tamanrasset), « AL-THAGHAR » à Gezira (Khartoum) ou encore « JATHJATH » en Arabie Saoudite (ALNOUR, 2007).

2. Classification

Selon la taxonomie de Cronquist (1981), la plante *Pulicaria crispa* est classée comme suit :

Règne :	Plantae
Sous règne :	Tracheobionta
Division :	Magnoliophyta
Classe :	Magnoliopsida
Sous classe :	Asteridae
Ordre :	Asterales
Famille :	Compositae
Genre :	<i>Pulicaria</i>
Espèce :	<i>Crispa</i>

3. Description

Pulicaria crispa se développe très rapidement, tolère les conditions désertiques difficiles et pousse sur des sols sablonneux et rocheux et peut également être propagée par graines (ZOGHET et AL-ALSHEIKH, 1999). Plante annuelle (vivace), à racines pivotantes, de 12 à 75 cm de haut, à tiges densément ramifiées de la base de la plante à aspect feutré dû au couvert de poils blancs laineux. Ses feuilles sont sessiles ; quelque peu amplexicaules, linéaires à obtus, ondulées et rarement dentées, tomenteuses des deux pages de poils laineux, atteignant 0.5 à 6 cm ; et sont beaucoup plus petites sur les tiges supérieures. Les fleurs sont solitaires, terminales, hémisphériques et hétérogames. Elles sont très visibles, de couleur jaune d'or à orangée, de 0.5 à 1 cm de diamètre, elles ont la spécificité d'être nombreuses, bractées, acuminées, glabres ou ciliées et souvent glandulaires (CHAUDHARY, 2000). Les akènes cylindriques sont lisses ou à peine côtelés, parsemés de poils blancs antorsés et

couronnés d'une aigrette double constituée de 6-8 soies ou 9-10 soies à peine scabres et d'une cupule externe irrégulièrement dentée (NEGRE, 1962).



Figure 13 : Macrographie de *Pulicaria crispa*



Figure14 :Photo de la plante *Pulicaria* (photo originale)

4. Origine et répartition géographique

Cette espèce ou ce genre, voir cette famille en général préfère les lieux humides ; marais et Dayas (CHAUDHARY, 2000). Cette flore a pour origine plusieurs pays à savoir quelques pays d'Afrique : Algérie (Tamenraset; Hogar), Maroc, Tchad, Mauritanie, Soudan, Egypte, Lybie, Niger, Somalie, Tunisie, Sénégal et le Cameroun. Cette plante a été signalée également du côté de l'est : Palestine, Liban, Qatar et Arabie saoudite. On remarque donc que la distribution de *P.crispa* est principalement Nord africaine et moyenne orientale (péninsule arabique) (EL-EGAMI, 1989).



Figure 15 : Distribution de *Pulicaria crispa* en Afrique du nord et au moyenne orientale.

(<https://ca.wikipedia.org>)

5. Utilisation et propriétés thérapeutiques

L'utilisation des feuilles de *P.crispa* est orientée vers plusieurs vols ; en tant qu'épices afin de relever le goût des aliments, en tant qu'infusions (tisanes), pour repousser les insectes...etc. (QAID M. EL-HAJJ *et al.*, 2014).

D'après la même source, les membres de ce genre sont également traditionnellement utilisés pour leurs bienfaits sur la santé :

- Réduction des symptômes de la grippe et du rhume.
- Traitement des maux de dos.
- Soulagement des troubles intestinaux.
- Traitement des blessures (MOTHANA *et al.*,2009).
- Effet tonique.
- Relaxant et anti stress.

Il est scientifiquement rapporté que les membres du genre *Pulicaria* en général possèdent d'autres propriétés thérapeutiques très importantes, spécialement l'espèce que nous étudions, on cite : (MOTHANA *et al.*,2009).

- Activité antioxydante.
- Activité antimicrobienne.
- Activité anti leucémique.
- Activité anti spasmodique.
- Activité anti cancéreuse .

Il ne faut pas également négliger ses propriétés galactagogues et anti épileptique (CHHETRI *et al.*, 2015).

6. Composition chimique

Les espèces du genre *Pulicaria* contiennent divers composés bioactifs, qui sont d'ailleurs la raison des multiples propriétés thérapeutiques de ces plantes. D'après la littérature, on peut citer :

- Monoterpènes.
- Flavonoïdes.
- Acétylènes.
- Isocomènes.
- Lactones sesquiterpéniques.

7. Généralités sur le climat saharien

Malgré les conditions désertiques très rudes, il existe un couvert floristique caractéristique bien adapté aux contraintes abiotiques de cet écosystème. Ces conditions

extrêmes font que le maigre couvert végétal qui subsiste, développe des stratégies d'adaptation lui permettant d'exploiter au maximum les moindres conditions climatiques favorables à sa prolifération (CHEHMA, 2011).

La végétation des zones arides, et particulièrement celle du Sahara est très parsemée, à aspect en général nu et désolé, les arbres sont aussi rares que dispersés et les herbes n'apparaissent que pendant une période très brève de l'année, quand les conditions deviennent favorables (SCHIFFERS, 1971).

7.1. Caractéristiques floristiques

Selon le mode d'adaptation à la sécheresse, les plantes sahariennes peuvent être divisées en deux catégories biologiques :

7.1.1. Les plantes éphémères

Ces plantes n'apparaissent qu'après des périodes de pluies et effectuent tout leur cycle végétatif avant que le sol ne soit desséché. Elles sont fort capricieuses et n'occupent que sporadiquement et fugacement le terrain (LE HOUEROU, 1990). Malgré leur aspect temporaire, ces espèces sont à la base de la diversité floristique de l'écosystème saharien. En effet, elles représentent plus de 3/4 de la richesse floristique du Sahara (CHEHMA *et al.*, 2005) Par contre leur part de la productivité de la phytomasse des parcours sahariens est négligeable et présente à peine le 1/450 ème de la productivité des plantes vivaces (CHEHMA *et al.*, 2008).

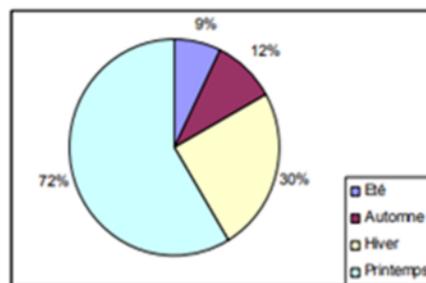


Figure 16 : Répartition saisonnière du taux de présence des espèces éphémères (CHEHMA *et al.*, 2008).

7.1.2. Les plantes vivaces

Elles ont la capacité de survivre en vie ralentie durant de longues périodes et sont dotées de mécanismes d'adsorption racinaire et de rétention d'eau très performants (OZENDA, 2004), ces plantes sont toujours disponibles quelque soient les aléas climatiques (CHEHMA et DJEBAR, 2008). Malgré qu'elles sont moins riches en espèces que les

éphémères, ce type de végétation est moins sujet aux variations saisonnières, il subsiste pendant la saison critique et constitue les seuls parcours camelins toujours disponibles même en été (CHEHMA, 2006) (OZENDA, 2004). La plus grande partie des espèces vivaces inventoriées (82%) est utilisée en médecine traditionnelle (CHEHMA et DJEBAR, 2008).

Partie
expérimentale

Ce présent travail s'est réalisé dans le cadre de la préparation d'un mémoire de Master en Microbiologie Appliquée à l'Université de Tizi Ouzou.

Il est constitué de deux parties : la partie physico-chimique qui s'est faite au niveau d'un laboratoire de recherche du département BMC, université Mouloud MAMMERY, Tizi-Ouzou, durant la période allant du 18 mars au 12 avril, et partie microbiologique qui s'est déroulée au laboratoire pédagogique de microbiologie dans la période du 17 avril au 31 mai.

I-Matériel

I.1. Matériel biologique

I.1.1. La plante

La récolte de la plante a été faite dans la région du Hoggar, wilaya de Tamanrasset, située au sud de l'Algérie, à 1931.8 Km environ de la capitale Alger. La wilaya est limitée au nord par les wilayas de Ghardaïa et de Ouargla, à l'est par la wilaya d'Illizi, à l'ouest par la wilaya d'Adrar et au sud par le Mali et le Niger.

Le Hoggar s'étend sur une superficie de 50.000 Km² et s'élève à 2918m d'altitude (figure 17).

La cueillette de la plante a été faite en mois de janvier et en mois de mars (2018). En cette période, la plante était en pleine floraison,

Dans notre étude, toute la partie aérienne de la plante a été utilisée (à savoir les tiges, les feuilles et les fleurs).

L'identification de l'espèce a été faite par une botaniste du département de biologie de l'université Mouloud MAMMERY de Tizi Ouzou.



Figure 17 : Lieu de récolte de la plante.

I.1.2. Souches microbiennes

Les germes utilisés dans ce travail sont des souches bactériennes cliniques ou de référence, ainsi qu'une levure et une moisissure. Les souches cliniques ont été isolées de

divers produits biologiques au laboratoire d'analyses médicales de M'douha, lotissement HAMDAD Tizi Ouzou et au niveau du CHU de Tizi Ouzou.

Les souches de référence ont été obtenues d'un laboratoire de recherche du département BMC de l'université Mouloud MAMMERI de Tizi Ouzou, conservées dans un milieu de conservation. Les tableaux ci-dessous détaillent l'origine des souches étudiées :

Tableau 1 : Souches de références utilisées.

Souches	Références
<i>Staphylococcus aureus</i>	MuSo mecA SARM
<i>S. aureus</i>	LG A251 SARM mecC
<i>S. aureus</i>	ATCC 25923
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 14579
<i>B. cereus</i>	ATCC 10876
<i>Enterococcus faecalis</i>	WDCM 00009

Tableau 2 : Origine des souches cliniques.

Souches	Type de prélèvement	Origine
<i>Escherichia coli</i>	Pus	LAMM
<i>E. coli</i>	Urines (femme enceinte)	LAMM
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pus (pied)	LAMM
<i>Candida albicans</i>	Squame	LAMM
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (1)	Infection respiratoire	CHU
<i>K.pneumoniae</i> (2)	IR	CHU
<i>K. pneumoniae</i> (3)	IR	CHU
<i>K.pneumoniae</i> (4)	IR	CHU
<i>K. pneumoniae</i> (5)	IR	CHU

LAMM : Laboratoire d'Analyses Médicales de M'douha.

IR : Infection Respiratoire

I.2. Matériel non biologique

1.2.1. Milieux de culture utilisés

Les milieux de culture utilisés dans le présent travail sont ci-dessous :

- Bouillon BHIB.
- Bouillon BHIB additionné de saccharose.
- Bouillon TSB.
- Gélose MH.
- GN.

- Sabouraud.
- PDA.

I.2.2. Solvants utilisés

Les solvants organiques utilisés :

- Méthanol 85%.
- DMSO.
- Propanol.
- Alcool iso-amylique.
- Ammoniaque.
- Ether.

I.2.3. Réactifs utilisés

- Acide chlorhydrique (HCL).
- Chlorure de fer (FeCl_3).
- Acétate de sodium ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$).
- Chloroforme (CHCl_3).
- Coupons de Zinc.
- Sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4).
- Acétate de plomb ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4$).
- Follin.
- Carbonate de sodium (Na_2CO_3).

Autres

- Acide gallique.
Violet de Gentiane

I.2.4. Antibiotiques

Pour la réalisation des antibiogrammes, on a eu recours aux antibiotiques suivants : Ampicilline (Amp), Céfazoline (CZ), Céfoxitine (Fox30), Céfotaxime (CTx), Imipinème (ImI), Amikacine (AK30), Gentamicine (Gen10), Acide nalidixique (Na30), Ciprofloxacine (CIP 5), Colistine (CL), Nitrofurane (NIT100), Cotrimoxazole (CoT25), Fosfomycine (FF200), Penicilline (P10), Oxacilline (OX1), Canamycine (K30), Erythromycine (E15),

Clindamycine (DA2), Pristinamycine (RP15), Ofloxacin (OF5), Vancomycine (VA), Tétracycline (TE30), Acide fusidique (FC10), Ticarciline (TI), Pipéracilline (PRL), ciftazidime (CaZ), Aztréonam (ATm), Tobramycine (Tob).

I.2.5. Appareils

La réalisation de ce travail a nécessité l'utilisation des appareils suivants :

- Extracteur d'huiles essentielles.
- Spectrophotomètre visible (Biotech Engineering Management CO.LTD).
- Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).
- Rotavapeur (Stuart).
- Lyophilisateur (Chaist).
- Lecteur de microplaque (ELISA Plate Analyser).
- Etuve 37°C et 28°C (MEMMERT).
- Autoclave (Wisd).
- Four Pasteur (MELAG).
- Microscope (Optika microscops).
- Balance (KERN, PCB).
- Vortex (VELP scientifica, Techno Kartell).
- Pied à coulisse électronique.
- Moulin à café (SAYONA).
- Agitateur magnétique (HANNA Instruments).
- Bain-marie (MEMMERT, Wisd).
- Agitateur à chaud (VWR).
- Réfrigérateur (Maxipower, ENIEM).

I.2.6. Verrerie et autre matériel

- Cellule de Mallassez.
- Microplaque de 96 puits.
- Tube à essai à vis.
- Pipettes Pasteur.
- Pipettes graduées.
- Flacon.

- Béchers.
- Entonnoir.
- Eprouvette.
- Erlenmeyer.
- Cristalliseur.
- Anse à boucle.
- Spatules.
- Micropipette 10, 100, et 1000 μ l.
- Ecouillons.
- Boîtes de Pétri simple et cloisonnées.
- Portoirs.
- Bec Bunsen.
- Papier filtre.
- Barreau magnétique.
- Cuves.
- Godets.
- Embouts.

II. Méthodes expérimentales

1. Récolte, séchage et broyage

La cueillette s'est faite en utilisant des ciseaux et en prenant en considération un seul site. Le séchage s'est fait sur du papier journal dans un endroit ouvert mais à l'abri du soleil afin de pouvoir conserver le maximum des métabolites secondaires de la plante.

La plante est ensuite broyée à l'aide d'un moulin à café, le résultat est passé au tamis afin d'obtenir une poudre très fine.

Enfin, la poudre est conservée dans un bocal en verre à l'abri de la lumière et de l'humidité.



Figure18 : aspect de la poudre obtenue après broyage de la plante.

2. Screening phytochimique

Constitue un ensemble de tests colorimétriques, qui permettent de mettre en évidence les métabolites secondaires produits par la plante, à partir de sa poudre ou de l'infusé. Le tableau ci-dessous montre les tests effectués :

2.1. Préparation de l'infusé

L'infusé a été préparé à l'ordre de 10%, en ajoutant 50ml d'eau distillée bouillante dans 5g du broyat de la plante et laissé pendant 15 min. Le mélange est ensuite filtré à l'aide d'un papier filtre, le filtrat isolé représente l'infusé.

Tableau 3 : Protocole du screening phytochimique (Raaman *et al.*, 2006).

Métabolites secondaires Recherchés	Méthodes	Résultat attendu
Anthocyanes	5ml d'infusé + quelques gouttes d'HCL.	Coloration rouge
Leuco-anthocyanes	2 g de poudre+ 20 ml de propanol / acide chlorhydrique (1/1). Porter à ébullition au bain Marie.	Coloration rouge
Tanins totaux	5ml d'infusé + quelques gouttes de FeCl ₃	Coloration bleue noire
Iridoïdes	2 ml d'infusé + quelques gouttes d'acide chlorhydrique. Chauffer un peu.	Coloration bleue
Tanins galliques	1ml d'infusé + 2g d'acétate de sodium+quelques gouttes de FeCl ₃ .	coloration bleue foncée
Alcaloïdes	5g de poudre + 50 ml d'ether : chloroforme 3/1 Filtrer après 24h puis épuiser avec du HCL.	Précipité rouge
Flavonoïdes	À 5 ml d'infusé + 5 ml d'acide chlorhydrique + un coupon de Zinc +1 ml d'alcool iso-amylque.	Coloration rouge orangée
Sénosides	2,5 g de poudre + 50 ml d'eau distillée + 2 ml d'acide chlorhydrique concentré. Chauffer pendant 15 min+40 ml d'éther. La couche étherée est séparée, séchée avec le sulfate de sodium anhydre, évaporée+ 5 ml d'ammoniaque diluée (1/2) au résidu refroidi.	Coloration violette rouge
Quinones	Humecter 2 g de poudre par 2 ml d'acide chlorhydrique+ 20 ml de chloroforme. Après 3 heures, le filtrat est agité avec 5 ml d'ammoniaque (1/2).	Coloration rouge
Mucilages	5 ml d'éthanol absolu sont ajoutés à 1 ml	Précipité floconneux

	d'infusé. Le mélange est incubé pendant 15 minutes.	
Saponosides	A 2 ml d'infusé, on ajoute quelques gouttes d'acétate de plomb.	Formation d'un précipité blanc.

3. Extraction des polyphénols

L'extraction des polyphénols de *Pulicaria crispata* est réalisée dans un solvant organique, le méthanol à 85%. Il s'agit d'un procédé d'extraction solide-liquide suivant le protocole de (OSKAY *et al.*, 2013).

- Peser 20g de poudre.
- Mettre la poudre dans un bocal à couvercle et y ajouter 200ml de méthanol à 85%.
- Bien couvrir le bocal de papier aluminium afin d'éviter la dégradation des molécules par la lumière.
- Lancer la macération en alternant entre laisser le mélange sous agitation magnétique et le mettre au réfrigérateur à +4°C pendant 72h.
- L'extrait est par la suite filtré avec du papier filtre.
- Le filtrat est concentré en éliminant la plus grande partie du solvant à l'aide d'un rotavapeur.
- L'extrait obtenu est mit dans un tube bien fermé, recouvert de papier aluminium et placé au réfrigérateur à +4°C.

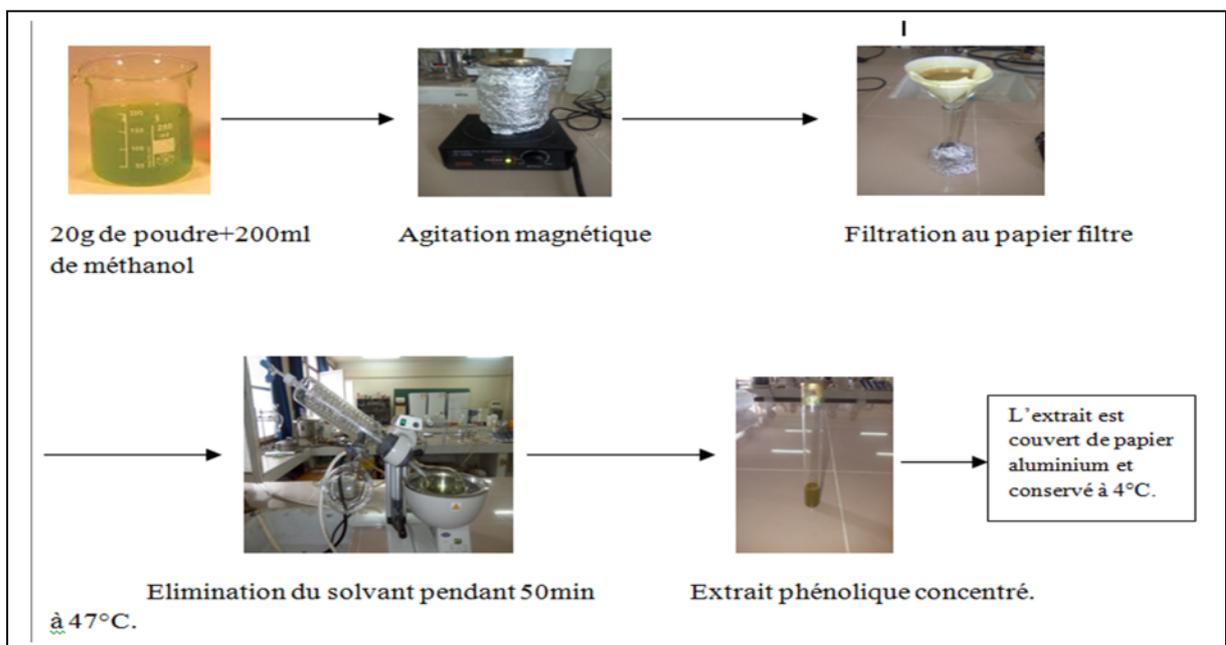
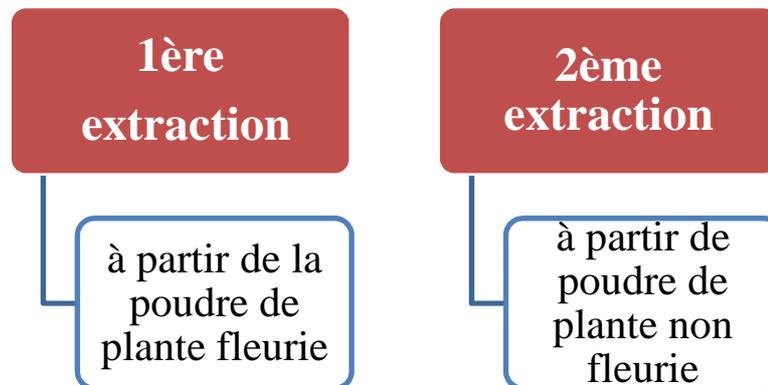


Figure 19 : Différentes étapes de l'extraction des polyphénols.

Au cours de notre travail, on a réalisé deux extractions méthanoliques, comme schématisé ci-dessous :



4. Rendement des polyphénols

Le rendement d'extraction est calculé par la formule donnée par (FALLEH *et al.*, 2008) :

$$\text{Rdt (\%)} = m_{\text{ext}}/m_{\text{éch}} \times 100$$

Où : Rdt : rendement en %; m_{ext} est la masse de l'extrait après évaporation du solvant en g et $m_{\text{éch}}$ est la masse sèche de l'échantillon végétal en g.

5. Quantification des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols est réalisé à l'aide du réactif Folin-Ciocalteu ; mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique, réduit lors de l'oxydation des phénols, en mélange d'oxydes bleus de tungstène (W8O23) et de molybdène (Mo8O23). La coloration bleue produite possède une absorption maximale de 760 nm. Elle est proportionnelle aux taux de composés phénoliques (HOGAN *et al.*, 2009), (SEGAL *et al.*, 2008). Le mode opératoire du dosage des extraits bruts et de l'étalon est précisé dans le tableau suivant (OJEIL *et al.*, 2010).

Tableau 4 : Mode opératoire du dosage des extraits bruts et de l'étalon.

	Echantillons	Acide gallique
DMSO	1,58mL	/
Ether	/	1ml
Echantillon	10µL	/
Follin	100µL	100µL

Acide gallique	/	0,5mg
mélanger et attendre 5 min à T° ambiante		
Na ₂ CO ₃	300μL	300μL
incuber à l'obscurité, à 20°C pendant 2h		

Après l'incubation, on réalise une lecture des DO pour chacun des extraits bruts et des dilutions à la longueur d'onde 760nm.

Ce protocole est reproduit pour chaque dilution des extraits bruts ainsi que celles de l'étalon.

➤ **Dilutions des échantillons**

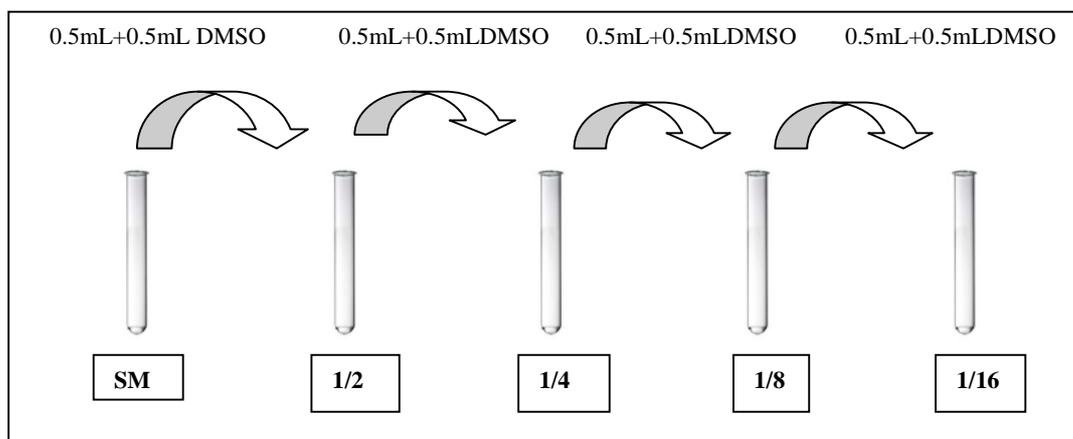


Figure20 : Dilutions des extraits brutes (solide/liquide).



Figure 21 : Dilutions de l'extrait solide.
(Photo prise au labo)



Figure 22 :Dilutions de l'extrait liquide.
(Photo prise au labo)

5.1. Réalisation de la gamme étalon

La solution standard de l'acide gallique est de 0.5mg/mL (éthanol à 10%). Les dilutions sont réalisées comme suit (OJEIL *et al.*, 2010) :

Tableau 5 : Méthodologie des dilutions de l'étalon (acide gallique).

Dilutions à réaliser (mg/L)	V ₂ (mL)	V _{Eth} (mL)	Concentration finale (mg/mL)
500 (SM)			0,5
450	0,9	0,1	0,45
400	0,8	0,2	0,4
350	0,7	0,3	0,35
300	0,6	0,4	0,3
250	0,5	0,5	0,25
200	0,4	0,6	0,2
150	0,3	0,7	0,15
100	0,2	0,8	0,1
50	0,1	0,9	0,05
0	0	1	0

Les calculs sont réalisés avec la loi suivante :

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Avec : C₁ : concentration de la SM (mg/mL) C₂ : concentration de la dilution (mg/mL)

V₁ : volume final (1mL)

V₂ : volume de la SM à diluer (mL)

On calcul pour exemple la dilution 450 :

$$C_1V_1 = C_2V_2 \rightarrow 0.5 \times 1 = 0.45 \times V_2 \rightarrow V_2 = 0.45 \times 1 / 0.5 \rightarrow V_2 = 0.9 \text{ mL}$$

$$V_{\text{Eth}} = V_1 - V_2 \rightarrow V_{\text{Eth}} = 1 - 0.9 \rightarrow V_{\text{Eth}} = 0.1 \text{ mL}$$

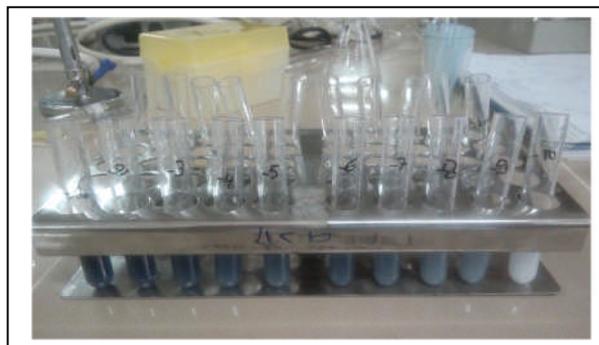


Figure 23 : Gamme étalon d'acide gallique.

6. Extraction de l'huile essentielle

L'extraction a été réalisée par la technique de la distillation par entraînement à la vapeur dans le dispositif montré dans la figure ci-dessous. Avant l'emploi, l'appareil a été bien rincé à l'eau distillée afin d'éliminer les poussières.



Figure 24: Extracteur des huiles essentielles par entraînement à la vapeur (photos originale).

L'extraction s'est faite à partir de 263g de la partie aérienne de la plante. La matière végétale est mise soigneusement sur la grille métallique au fond de l'extracteur, une fois la plante bien tassée à l'intérieur de la cuve, on verse dessus de l'eau distillée afin de la bien rincer. On n'arrête le rinçage que lorsque l'eau s'échappant soit claire et limpide. La cuve est ensuite bien celée on serrant les boulons. Le générateur de vapeur est rempli d'eau distillée, fermé et placé sur une plaque chauffante. Le générateur de vapeur est stabilisé à 100°C et à une pression allant de 0.4 à 0.6 bars. Une fiole recouverte de papier aluminium est placée en aval du dispositif afin de récupérer l'eau florale et l'huile essentielle condensée puis liquéfiée, résultant de la distillation (MEBARKA, 2008). Le temps d'extraction a duré 3 heures. A la fin de la distillation, on laisse l'eau florale décanter, puis on ouvre le robinet pour évacuer une partie de cette dernière. La séparation de l'huile se fait avec l'ether. L'HE

obtenue est mise dans un godet recouvert de papier aluminium et placé au réfrigérateur à +4°C.

7. Rendement de l'huile essentielle

Le rendement en huile a été estimé par rapport au volume obtenu et la masse de matière végétale. Il est exprimé en pourcentage et calculé selon la formule suivante :

$$\text{RHE} = (\text{VHE}/\text{MV}) \times 100$$

Avec : RHE : rendement en huile essentielle (%).

VHE : volume d'huile essentielle (mL).

MV : masse du matériel végétal (g).

8. Activités biologiques

8.1. Activité antibactérienne

8.1.1. Préparation de l'*inoculum* bactérien

- Les bactéries à tester ont été repiquées sur des boîtes de Pétri contenant la gélose MH puis incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures, afin d'obtenir des colonies jeunes est bien isolées, ceci dis, cette opération est répétée avant chaque test.
- Après le temps d'incubation, 1 à 2 colonies bactériennes sont prélevées à l'aide d'une anse de platine, puis mises en suspension dans un tube contant de l'eau physiologique.
- La densité de l'*inoculum* a été ajustée dans l'intervalle de 0.08-0.1, équivalant de 0.5 McFarland, grâce à un spectrophotomètre. L'*inoculum* ainsi réalisé est dilué dans 9mL d'eau physiologique, pour obtenir une suspension bactérienne voisinant les 10⁶UFC/mL de charge.

Exception : Les souches de *Klebsiella pneumoniae* conservées a -18°C, ont d'abord été revivifiées dans le BHIB, incubées 18heures, puis repiquées sur la gélose nutritive.

8.1.2. Antibiogramme

L'étude de la sensibilité des souches bactériennes a été réalisée par la méthode de disque ou antibiogramme standard. Des disques de papiers buvard imprégnés des antibiotiques à tester sont déposés à la surface du milieu préalablement préparé.

Pour chaque famille bactérienne, un ensemble d'antibiotiques spécifiques a été utilisé.

- **Ensemencement**

Dans des écouvillons, quelques mL de la suspension bactérienne sont versés et agités, la tige de l'écouvillon est bien essorée contre les bords du tube, la bactérie est ensemencée sur le milieu MH par des stries très serrées en 3 passages, en faisant pivoter les boîtes de Petri de 60°.

- **Dépôt de disques**

Les disques d'antibiotiques sont déposés sur la gélose, manuellement, avec une pince métallique stérile. Les boîtes sont incubées pendant 24 heures à 37°C.

- **Lecture**

La lecture se fait par mesure du diamètre de la zone d'inhibition obtenue autour des disques d'antibiotiques à l'aide d'un pied à coulisse, l'absence d'une zone d'inhibition correspond à une résistance bactérienne. L'interprétation se fait comme suit : sensible (S) ou résistante (R) ou intermédiaire (I). (Ponce *et al.*, 2003).

8.1.3. Etude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits

L'étude est réalisée par la méthode de diffusion de disques en milieu gélosé, initialement conçue pour les antibiotiques (antibiogramme), mais en substituant les disques d'antibiotiques par d'autres imprégnés par l'extrait polyphénolique et de l'huile essentielle (aromatogramme) (Schroeder et Messing, 1949) .

L'un des extraits utilisé a été dissous dans le DMSO, donc, un disque imprégné dans ce dernier a été déposé, comme témoin de son activité dans chaque boîte.

La sensibilité d'un germe est nulle pour un diamètre inférieur ou égale à 8mm. La sensibilité est limitée pour un diamètre compris entre 8 et 14mm, elle est moyenne pour un diamètre entre 14 et 20 mm. Pour un diamètre supérieur ou égale à 20 mm le germe est très sensible (Duraffourd *et al.*, 1990).

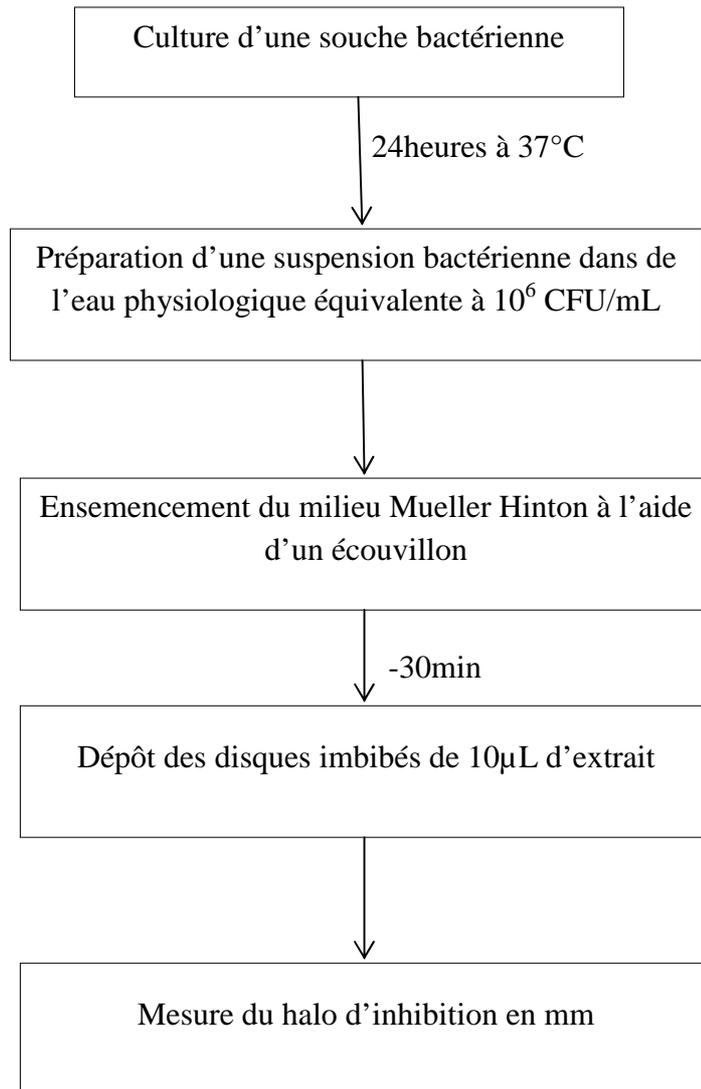


Figure 25: Etapes de réalisation de l'activité antibactérienne.

8.1.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice

Pour ce test, la méthode de diffusion de disque a été choisie. En premier lieu, des suspensions bactériennes ont été préparées à partir de cultures jeunes (âgées de 18 heures), puis ensemencées sur la gélose MH et laissées séchées.

Des disques de papier chromatographique de 6 mm de diamètre, préalablement stérilisés sont déposés à la surface de la gélose après avoir été chargée de 10µL d'extrait à tester dilué dans du DMSO (diméthylsulfoxyde) à 1/2, 1/4, 1/8, et 1/16 (v/v).

Après 24 heures d'incubation à 37°C, le diamètre d'inhibition est mesuré.

8.2. Activité antifongique

Un test antifongique a été réalisé pour la levure *Candida albicans* suivant la méthode de diffusion de disques en milieu gélosé, l'Amphotéricine B (Sungizon) a été appliqué sur cette levure en tant que témoin négatif, le test concernant la moisissure *Aspergillus niger* a été réalisé comme suit:

- Une suspension fongique a été réalisée dans l'eau physiologique à partir d'une culture jeune d'*Aspergillus niger*, repiquée sur PDA et incubée 72 heures à 28°C.
- Standardisation de la suspension à l'aide de la cellule de Mallassez, aux proximités de 10^7 cellules par millilitre. Le comptage des spores s'est fait par la méthode de la double diagonale et est égale approximativement à 100 spores par rectangle.
- Ensemencement de la moisissure sur PDA avec la méthode du râteau.
- Incubation à 28°C pendant 72h.
- Après incubation, des disques ont été incisés à partir de la boîte.
- Couler une boîte de Petri avec le milieu PDA et incorporer 20µl de l'extrait brute et laisser solidifier.
- Déposer le disque d'*Aspergillus* au milieu de la boîte.
- Incubation à 28°C pendant 5 jours. Le diamètre de la moisissure est mesuré chaque après 24h d'incubation.

8.3. Activité anti biofilm

8.3.1. Evaluation de la formation du biofilm par la méthode de tube (TM)

Cette technique permet une évaluation qualitative de la formation du biofilm (Christensen *et al.*, 1982).

A partir d'une boîte de culture bactérienne de 18-24 heures, ensemencer une colonie dans 10 mL de BHIB à 2% de saccharose puis incubé à 37°C pendant 24 h.

Après incubation, les tubes ont été lavés avec du PBS (pH=7,3) puis séchés. Chaque tube a été ensuite coloré au cristal violet (0,1%) pendant 15 minutes. L'excès de colorant a été enlevé et les tubes ont été lavés avec de l'eau distillée, puis séchés en position renversée (MATHUR *et al.*, 2006).

La formation du biofilm est considérée comme positive quand un film visible recouvre le mur et le bas du tube. La formation d'un anneau à l'interface liquide n'est pas indicative de la formation du biofilm (STEPANOVIC *et al.*, 2000).

8.3.2. Test de l'effet antibiofilm

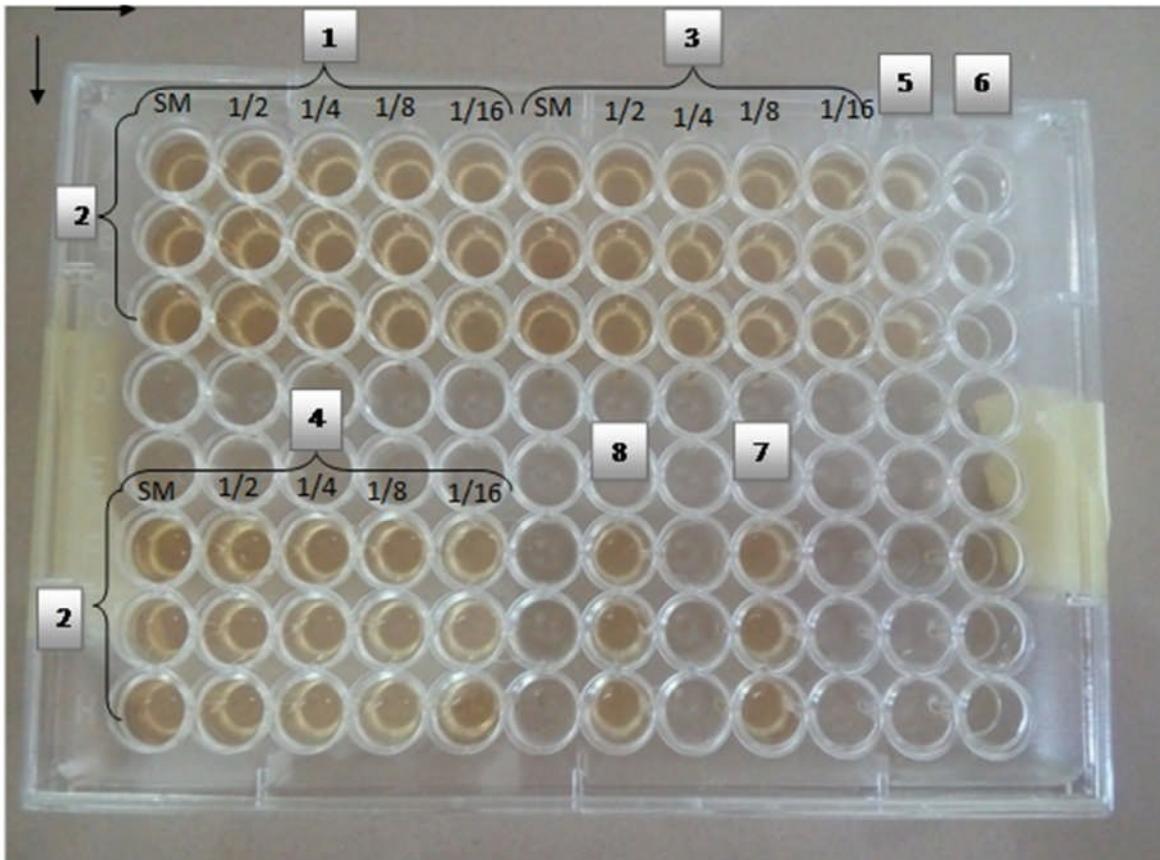


Figure 26 : Explication du protocole du test de l'activité antibiofilm.

Avec :

- 1 : puitsensemencés avec *Klebsiella pneumoniae* (1).
- 2 : nombre de répétitions.
- 3 : puitsensemencés avec *Klebsiella pneumoniae* (3).
- 4 : puitsensemencés avec *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
- 5 : T+ de *K. pneumoniae* (1).

6 : T- valable pour toutes les souches (BHIB).

7 : T+ de *K. pneumoniae* (3).

8 : T+ de *S. aureus* ATCC 25923.

1,3 et 4 : 100µl de l'inoculum+ 30µL de chaque dilution+ 70µL de bouillon TSB.

Après incubation de la plaque 24h à 37°C :

- Le contenu des puits est aspiré à l'aide d'une micropipette.
- Lavage avec le PBS 3 fois.
- Séchage à l'étuve pendant 15 min.
- Première lecture.
 - Coloration des puits avec le violet de Gentiane.
 - Rinçage avec l'eau distillée.
 - Séchage à l'étuve pendant 15 min
 - Relecture.

1. Screening phytochimique

Les résultats du screening phytochimique réalisé sur la plante *Pulicaria crispa* récoltée dans la région du Hoggar à Tamanrasset a montré la présence en grande quantité de mucilages, flavonoïdes et de saponosides, en moyenne quantité des alcaloïdes, des tanins totaux et des anthocyanes. Ce même test a montré l'absence des leuco-anthocyanes, des sénosides, des quinones ainsi que des tanins galliques et des irridoides.

Les résultats sont présentés dans le tableau et la figure ci-dessous :

Tableau 6 : Résultats du screening phytochimique

Numéro du test	Métabolites recherchés	résultats
1	Tanins totaux	++
2	Tanins galliques	-
3	Anthocyanes	+
4	Irridoïdes	-
5	Mucilages	+++
6	Saponosides	+++
7	Alcaloïdes	++
8	Leuco-anthocyanes	-
9	Flavonoïdes	+++
10	Sénosides	-
11	Quinones	-

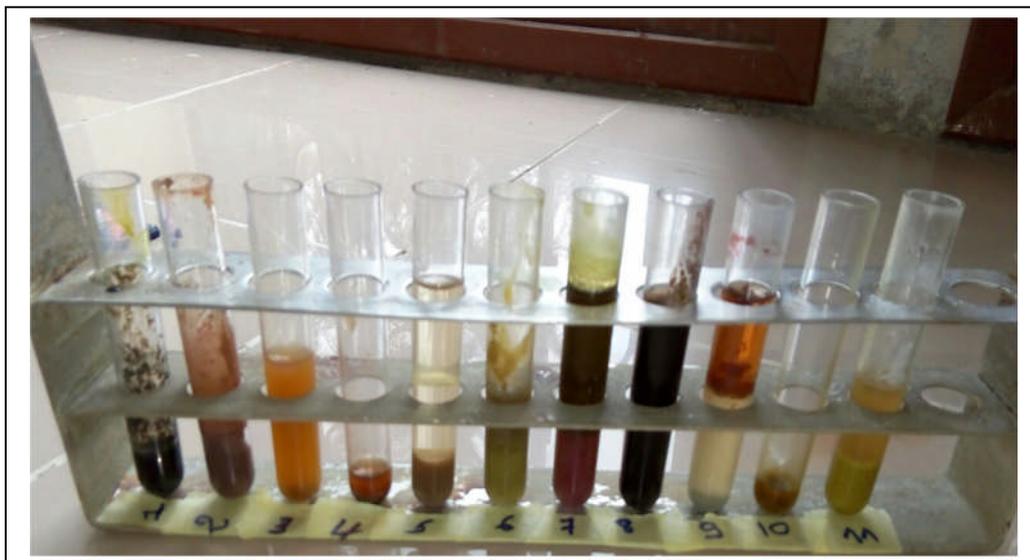


Figure 27 : Illustration des résultats du screening phytochimique.

Les résultats obtenus sont comparés avec ceux trouvés par ADEBIYI *et al.*, (2016). L'auteur a mis en évidence la présence de tannins et de flavonoïdes dans l'extrait méthanolique et les saponosides dans l'extrait N-hexane de la même plante récoltée à Samaru et Bassawa dans la région de Zaria, Kaduna au Nigeria.

La présence de flavonoïdes a été également mise en évidence avec la même plante récoltée en Algérie (Achouri)

Nos résultats se rapprochent de ceux trouvés par FOUDAH *et al.*, (2015), qui mettent en évidence la présence des alcaloïdes, saponosides, tanins totaux et des flavonoïdes dans l'extrait méthanoliques de *Pulicaria crispa* récoltée à Alkharj, région centrale de l'Arabie Saoudite.

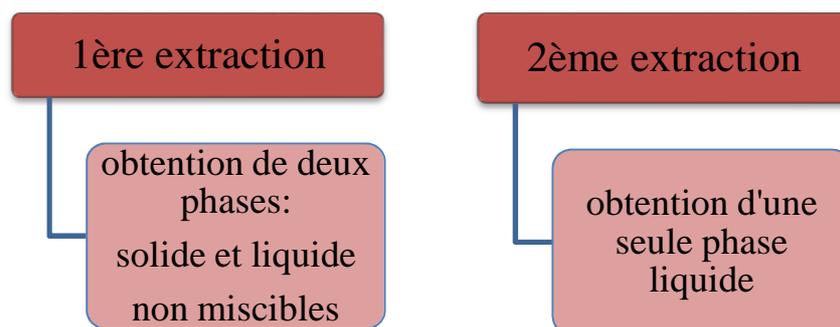
La présence des mêmes phytoconstituants dans la même plante de différentes origines serait due aux conditions climatiques et au sol où la plante a poussé.

Le screening effectué par DALI (2017) sur une plante du genre *Pulicaria (pulicaria incisa)* récoltée au Hoggar, Tamanrasset, a révélé la présence de tanins totaux, des sénosides et des quinones.

La richesse en ces métabolites serait due au climat, le sol, la période de récolte et cycle végétatif, la partie de la plante utilisée...etc.

2. Extraction des polyphenols

Les deux extractions des polyphenols ont donné des extraits d'aspects différents :



La première extraction a donné deux phases différentes, une phase solide qu'est sous forme de pâte visqueuse, brillante de couleur vert noirâtre avec une odeur aromatique forte et caractéristique de la plante. La phase liquide à un aspect aqueux avec une couleur marron orangée translucide et son odeur est faiblement olfactive.

Le deuxième extrait liquide et homogène se caractérise par sa forte odeur et sa couleur vert foncé ainsi que son aspect faiblement huileux.

L'extraction réalisée par DALI (2017) sur *Pulicaria crisper* récoltée au Hoggar, Tamanrasset, a donné un extrait visqueux brun verdâtre à odeur faiblement aromatique.

Les deux extractions réalisées dans le présent travail ont donné les rendements suivants:

- 1^{ère} extraction :

$$\text{Rdt}_{\text{ph.solide}} = m_{\text{ext}}/m_{\text{éch}} \times 100 \rightarrow \text{Rdt} = 0.610/20 \times 100 \rightarrow \text{Rdt} = 3.05\%$$

$$\text{Rdt}_{\text{ph.liquide}} = m_{\text{ext}}/m_{\text{éch}} \times 100 \rightarrow \text{Rdt} = 1.6/20 \times 100 \rightarrow \text{Rdt} = 8\%$$

- 2^{ème} extraction :

$$\text{Rdt} = m_{\text{ext}}/m_{\text{éch}} \times 100 \rightarrow \text{Rdt} = 0.7/10 \times 100 \rightarrow \text{Rdt} = 7\%$$

D'après ces résultats, on remarque que les deux extractions ont donné des rendements différents, la raison serait reliée à la période de récolte et à la présence de la fleur, en effet, la première extraction est réalisée à partir de la plante fleurie contrairement à la deuxième.

Le rendement de l'extrait de la même plante a été calculé par DALI (2017) et est égale à 8.83% ce qui est proche des résultats obtenus durant notre étude. Une autre plante du même genre (*Pulicaria incisa*) a été sujette du même auteur au calcul du rendement, qui a donné 4.14%. Ces rendements en polyphénols sont également comparés à ceux obtenus des extraits hydrométhanolique et aqueux de *Nauplius graveolens* de la famille des Asteraceae qui sont de 9.89% et 7.30%. (RAMDANE, 2018).

3. Dosage des polyphénols

Le dosage concerne les produits de la première extraction à savoir l'extrait solide et liquide, ainsi que la gamme étalon :

Tableau 7 : Do de la phase solide et liquide.

DO (760) Dilutions	Phase liquide	Phase Solide
extrait brute	1,93	3
1/2	1,68	2,59
1/4	1,23	1,72
1/8	0,78	0,86
1/16	0,51	0,6

Tableau 8 : Densités optiques de la gamme étalon réalisée à partir de l'acide gallique.

gamme étalon	DO (760nm)
50(0,05mg/ml)	1,455
100(0,1mg/ml)	2,191
150(0,15mg/ml)	2,238
200(0,2mg/ml)	2,486
250(0,25mg/ml)	2,481
300(0,3mg/ml)	2,55
350(0,35mg/ml)	2,517
400(0,4mg/ml)	2,55
450(0,45mg/ml)	2,693
500(0,5mg/ml)	2,74

A partir du tableau 8 on a réalisé une courbe d'étalonnage :

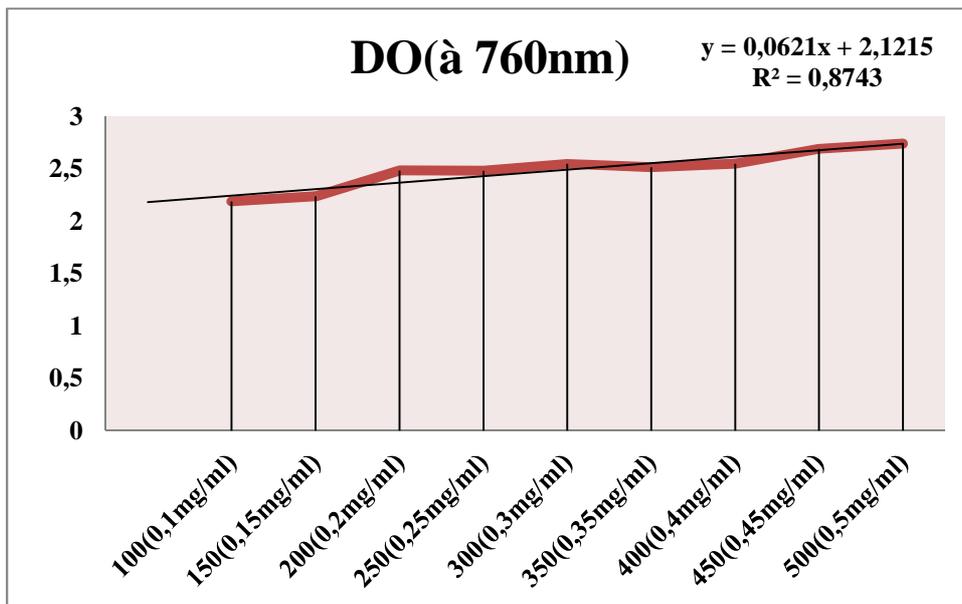


Figure 28 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

Le calcul de la concentration de l'extrait polyphénolique se fait à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage et a donné une valeur de 15,12 mg de polyphénols équivalent d'acide gallique dans 1mL d'extrait pour la phase solide. Pour ce qui concerne la phase liquide, le calcul de la concentration des polyphénols a donné une valeur de 3.08 mg de polyphénols équivalent d'acide gallique dans 1mL d'extrait.

NB : la courbe d'acide gallique doit être effectuée avec des DO qui ne dépassent pas 2, ce qui n'est pas le cas dans le présent travail.

La concentration des polyphénols est clairement plus élevée dans la phase solide que dans la phase liquide de l'extrait suite à leur condensation dans cette phase après l'évacuation du méthanol.

4. Rendement de l'huile essentielle :

La séparation de l'HE de *Pulicaria crispa* a donné un produit de couleur jaune pâle, à odeur forte et caractéristique. Le rendement de l'HE est de 7×10^{-3} %.

Qaid M. Al-Hajj *et al.*, (2014) a isolé l'HE de *Pulicaria inuloides* récoltée à Sana'a, Yemen, a donné un rendement de 0.5% qui est nettement plus élevé par rapport à 7.10^{-3} %.

L'éloignement de notre résultat de celui-ci pourrait être justifié par la sécheresse de la plante à son utilisation ainsi que l'extraction tardive après sa cueillette, ou encore par rapport à la région de récolte (Hoggar pour la présente étude et le Yemen), la phase du cycle végétatif de la plante, la zone de récolte et aussi les facteurs environnementaux (sol, vent, humidité, température, conditions d'ensoleillement ...). (DESCHEPPER, 2017).

Le rendement de l'HE peut aussi être influencé par les conditions de distillation et de conservation de la plante. (PETITET, 2012).

5. Antibiogrammes

Les deux souches d'*Escherichia coli* isolées sont résistantes à l'ampicilline.

La souche de référence d'*Enterococcus faecalis* WMDC 00009 étudiée a également montré une résistance à l'encontre de Céfazoline, Céfoxitine, Amikacine, acide nalidixique, Colistine et la Fosfomicine. (Tableau 9).

Les souches bactériennes de *Klebsiella pneumoniae* étudiées ont développé une résistance à l'encontre de divers antibiotiques, les pourcentages de résistance sont les suivants : 100% vis-à-vis l'Ampicilline, l'Amoxicilline, Nitrofurane, Cotrimoxazole), 80% vis-à-vis de (Céfazoline et Gentamicine, 60% vis-à-vis de l'Amikacine, 40% vis-à-vis de (l'Acide Nalidixique, Colistine, Fosfomycine) et 20% vis-à-vis de (l'Imipinème et la céfoxitine). (Tableau 9 et figure 29).

Résultats et discussion

Tableau 9 : Antibiogramme des Entérobactéries exprimé par le diamètre d'inhibition en millimètre.

Antibiotiques Bactéries	AMP	AMX	CZ	Fox	CTX	IMI	AK	Gen	Na	cip	CL	FF	Nit	cot
Diamètres critiques (mm)	14-19	14-17	19-23	14-18(G) /22(G+)	15-23	14-16	15-17	13-15	13-19	16-21	10-11	12-16	15-16	11-16
<i>Escherichia coli</i> (urine)	0 (R)	0 (R)	14 (R)	22 (S)	25 (S)	19 (S)	16 (I)	18 (S)	0 (R)	0 (R)	14 (S)	18 (S)	18 (S)	0 (R)
<i>Escherichia coli</i> (pus)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	15 (I)	14 (R)	11 (R)	10 (R)	13 (R)	10 (I)	15 (I)	11 (R)	0 (R)
<i>Eterococcusfeacalis</i> WDCM 00009	20 (S)	21 (S)	15 (R)	0 (R)	20 (I)	20 (S)	0 (R)	13 (I)	0 (R)	17 (I)	0 (R)	11 (R)	15 (I)	23 (S)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (2)	0 (R)	0 (R)	22 (S)	0 (R)	14 (R)	11 (R)	15 (S)	16 (I)	12 (S)	15 (I)	10 (R)	21 (S)	0 (R)	0 (R)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (4)	0 (R)	10 (R)	0 (R)	19 (S)	0 (R)	21 (S)	13 (R)	12 (R)	12 (R)	21 (S)	11 (I)	12 (R)	9 (R)	0 (R)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (5)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	22 (S)	8 (R)	21 (S)	14 (R)	10 (R)	15 (I)	18 (I)	11 (I)	9 (S)	10 (R)	7 (R)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (3)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	19 (S)	11 (R)	20 (S)	15 (I)	11 (R)	15 (I)	16 (I)	7 (R)	10 (S)	14 (R)	0 (R)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (1)	0 (R)	0(R)	7 (R)	20 (S)	0 (R)	19 (S)	14 (R)	14 (R)	12 (R)	20 (I)	11 (I)	0 (R)	15 (R)	0 (R)

(R) : résistance

(S) : sensibilité

(I) : intermédia

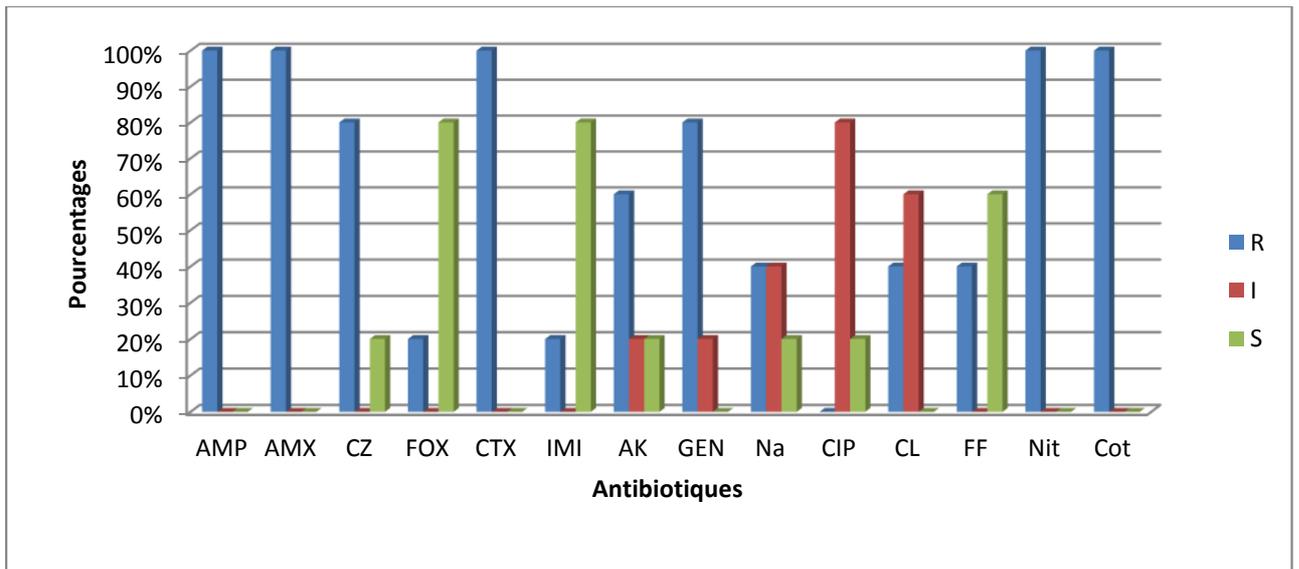


Figure 29 : Pourcentages de résistance, intermédiaire et de sensibilité des *Klebsiella pneumoniae* aux antibiotiques utilisés.

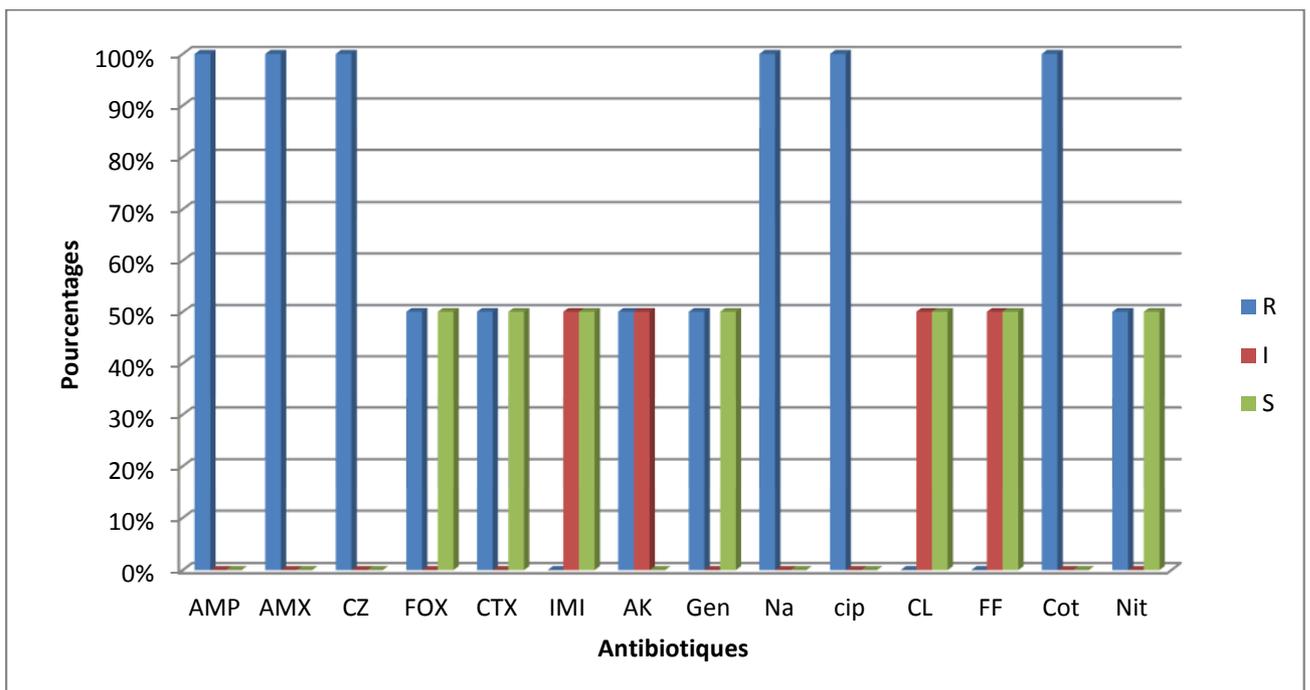
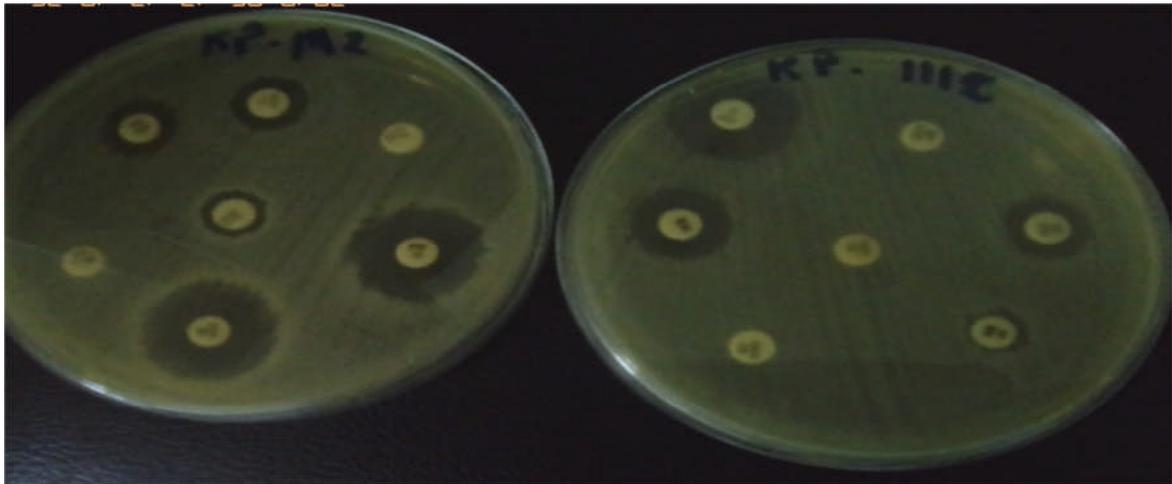
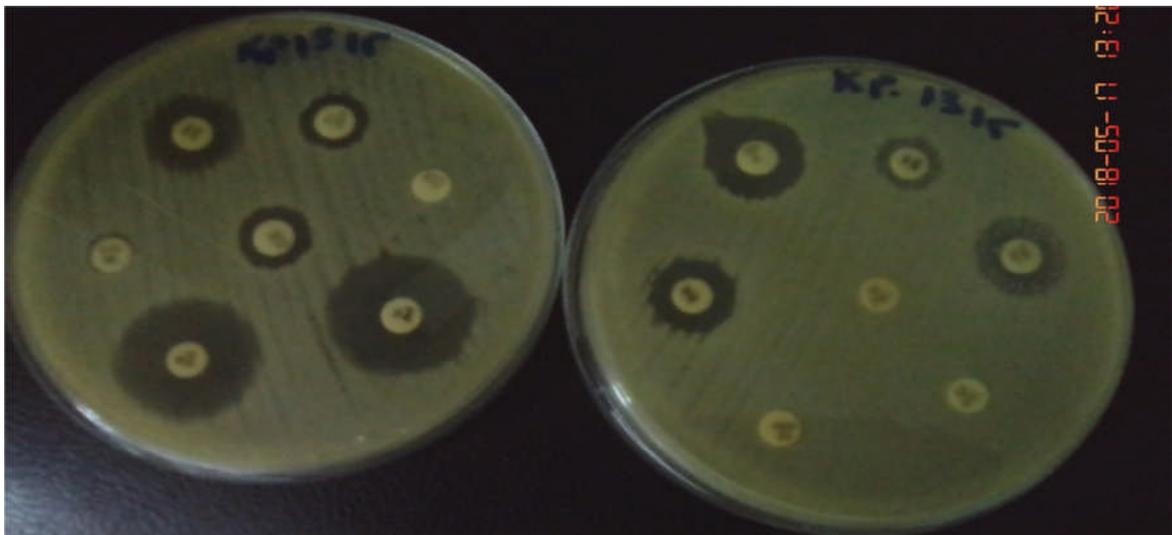


Figure 30 : Pourcentage de résistance, intermédiaire et sensibilité des souches de *Escherichia coli* aux antibiotiques testés.

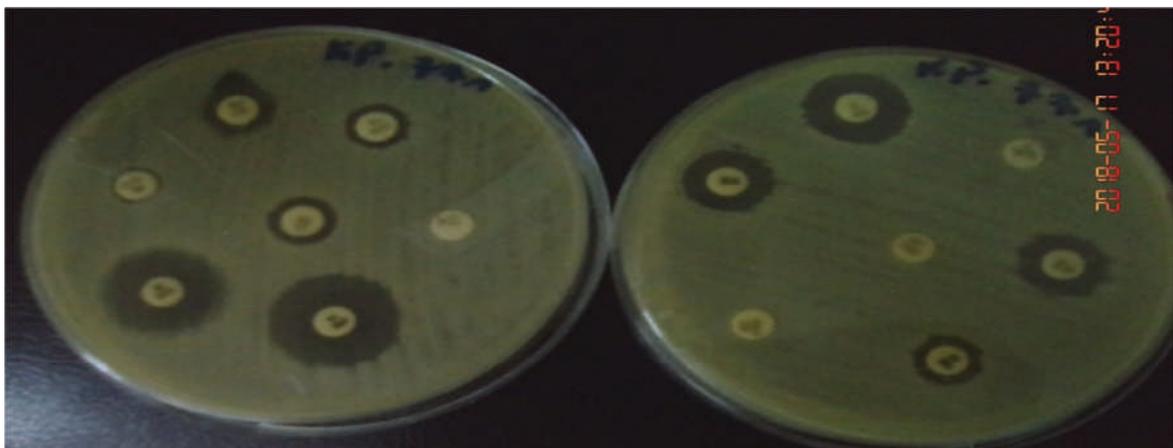
Contrairement aux bactéries précédentes, les souches de référence de *Staphylococcus aureus* étudiées ont montré de larges zones d'inhibitions aux divers antibiotiques testés ; excepté, le *Staphylococcus aureus* LGA 251 SARM mec C qui a résisté à la Penicilline (figure 33).



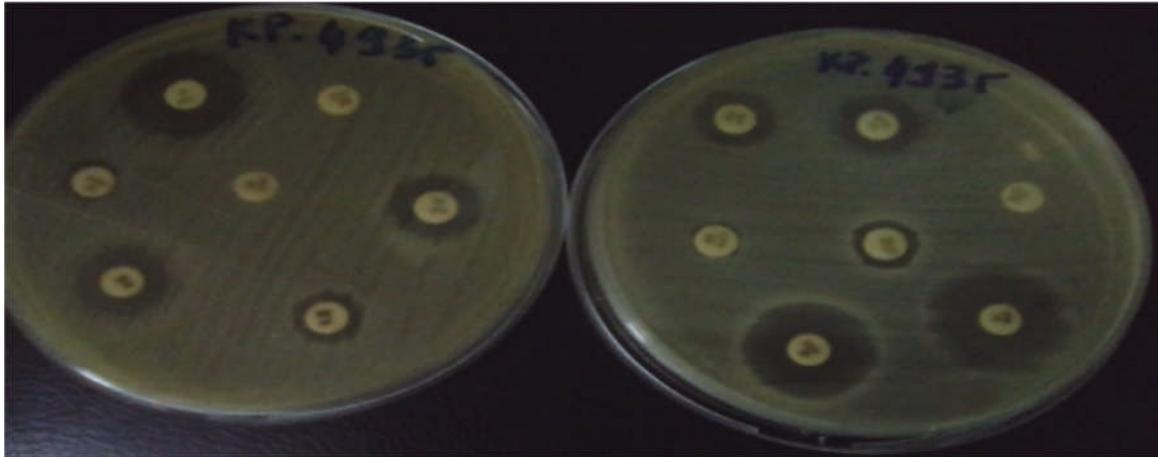
K.pneumoniae (1)



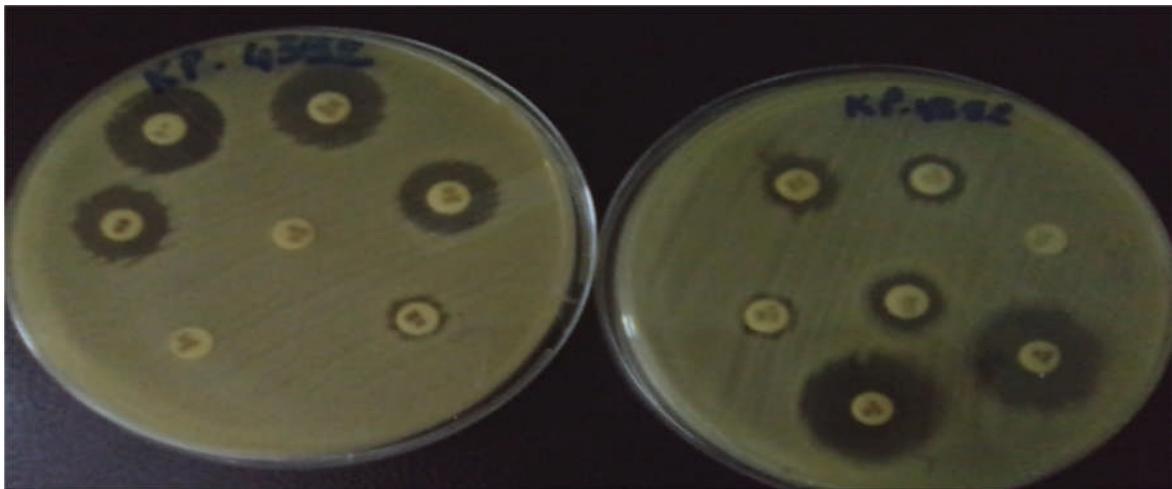
K.pneumoniae (2)



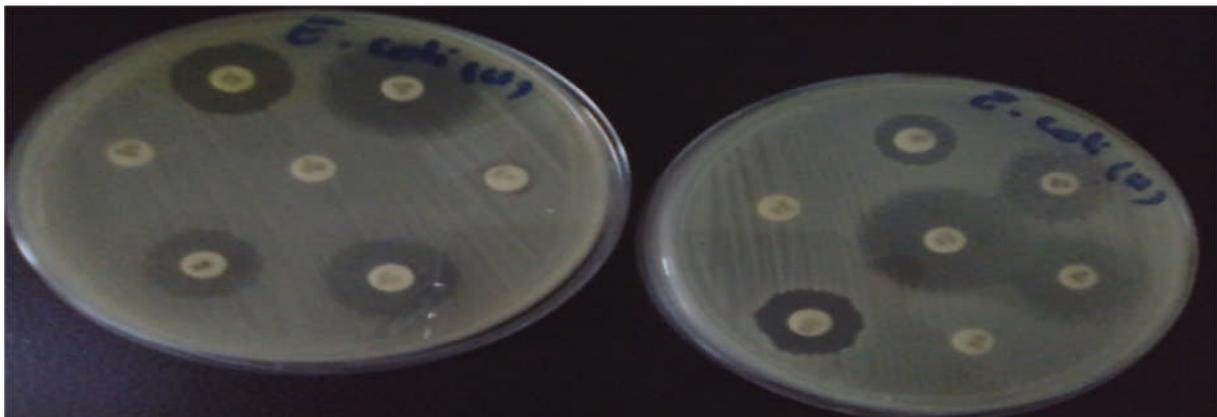
K.pneumoniae (3)



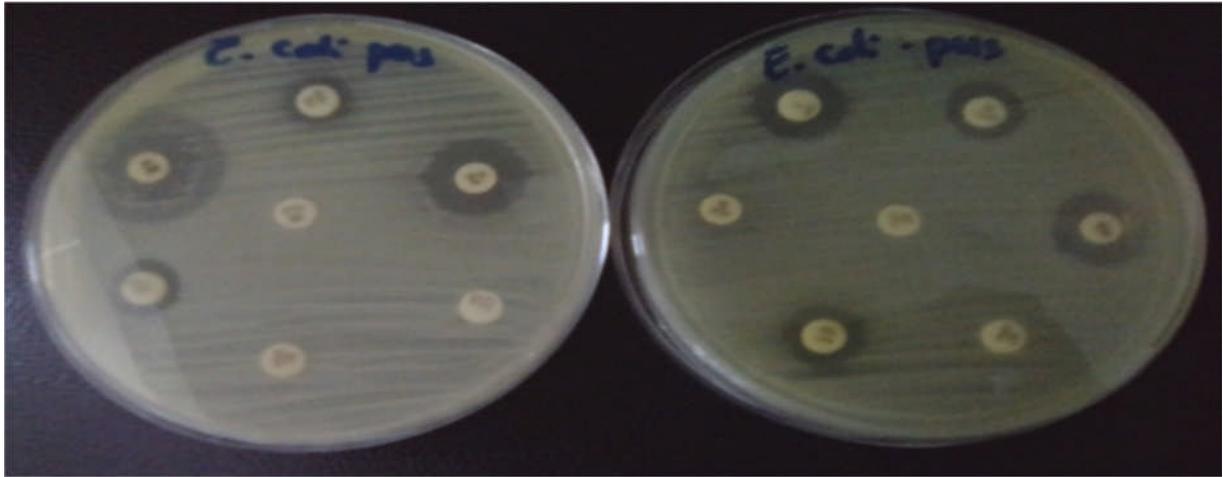
K.pneumoniae (4)



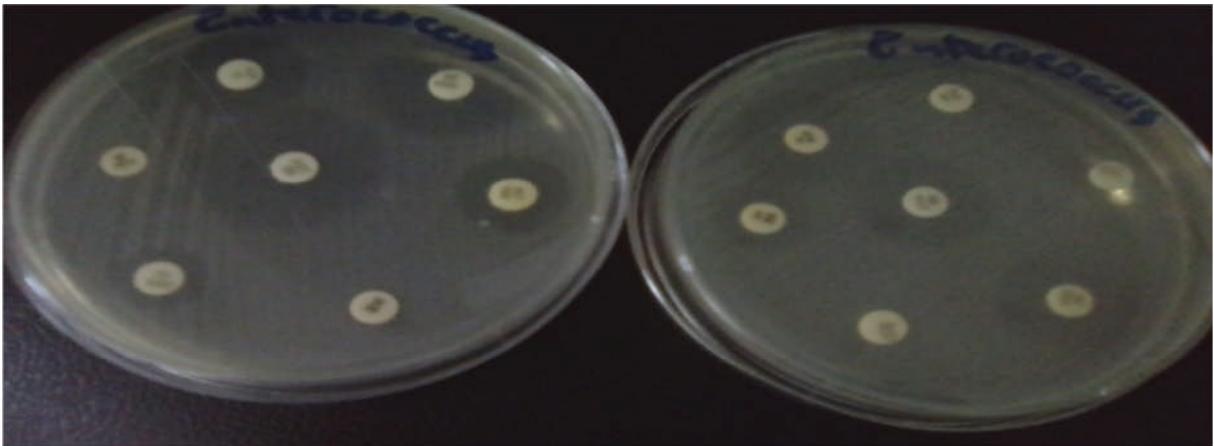
K.pneumoniae (5)



E.coli (urinaire)



E.coli (pus)



E.faecalis

Figure 31 : Résultats des tests antibiogrammes des Entérobactéries.

Résultats et discussion

Tableau 10 : Antibiogrammes des souches de *Staphylococcus aureus* exprimé par le diamètre d'inhibition en millimètre.

Antibiotiques	P	Ox	Fox	K	E	DA	RP	Gen	OF	VA	TE	CoT	Fc
Bactéries													
<i>Staphylococcus aureus 1</i>	20 (I)	25 (S)	30 (S)	20 (S)	22 (S)	21 (S)	18 (I)	20 (S)	21 (I)	15(I)	25(S)	25(S)	25 (S)
<i>Staphylococcus aureus 2</i>	0 (R)	25 (S)	25 (S)	18 (I)	24 (S)	20 (S)	24 (S)	20 (S)	20 (I)	15(I)	24(S)	25(S)	26 (S)
<i>Staphylococcus aureus 3</i>	35 (S)	25 (S)	28 (S)	18 (I)	23 (S)	20 (S)	20 (S)	19 (S)	20 (I)	14(I)	25(S)	22 (S)	25 (S)

(R) :résistance

(S) : sensibilité

(I) : intermédiaire

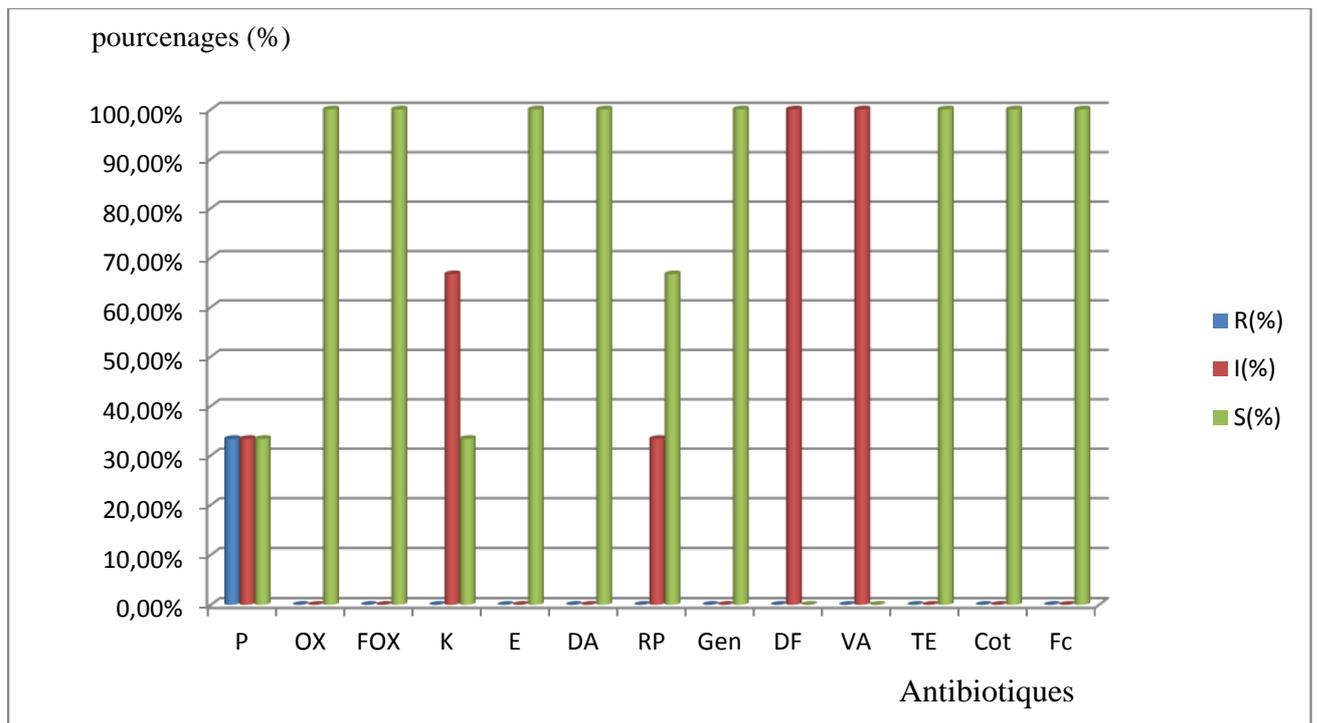
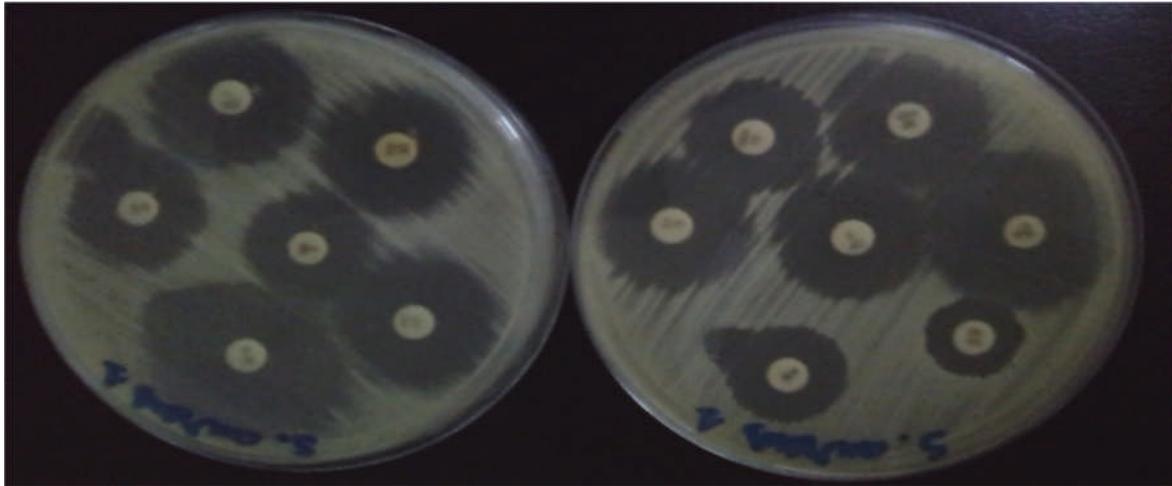
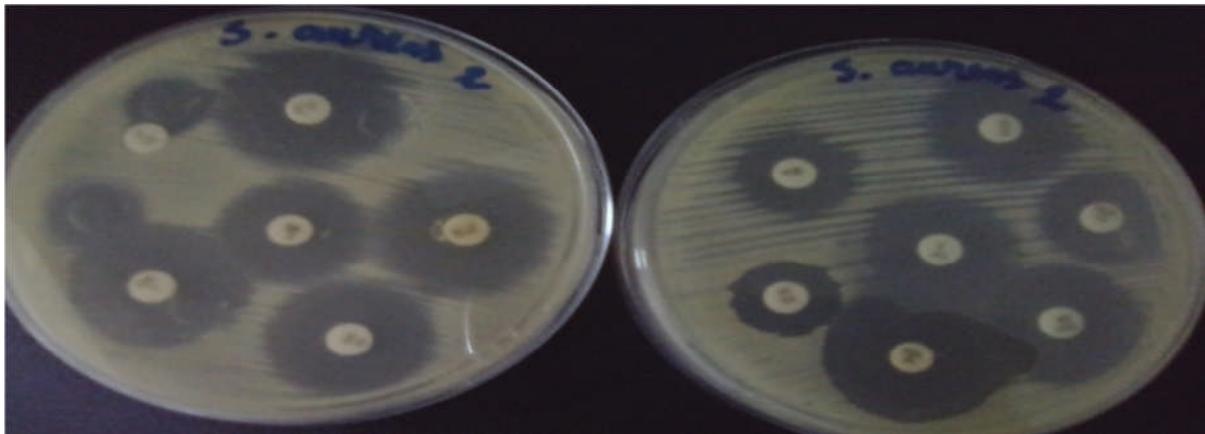


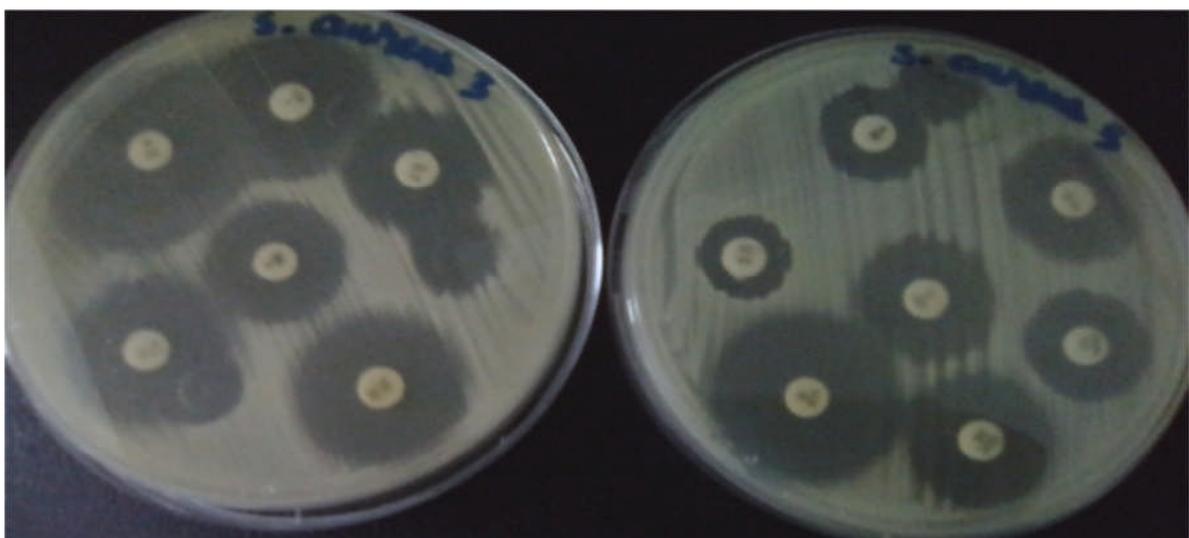
Figure 32 : Pourcentage de résistance, intermédiaire et de sensibilité de *Staphylococcus aureus* aux antibiotiques testés.



Staphylococcus aureus MuSo mecA



Staphylococcus aureus LGA 251 SARM mec C



Staphylococcus aureus 25923

Figure 33 : Résultats des tests antibiogrammes des Staphylocoques.

Résultats et discussion

La souche clinique *Pseudomonas aeruginosa* testée présente une résistance à la Ticarcilline, Pipéracilline, Tobramicyne et à la Gentamicine.

Tableau 11 : Antibiogramme de *Pseudomonas aeruginosa* exprimé par le diamètre d'inhibition en millimètre.

Antibiotiques bactéries	TI	PRL	CaZ	ATm	Tob	Gen	CIP	CL	FF	CTX
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13(R)	10(R)	20(S)	28(I)	8(R)	10(R)	20(I)	15(S)	12(I)	25(S)

(R) : résistance

(S) : sensibilité

(I) : intermédiaire



Pseudomonas aeruginosa (pus).

Figure 34 : Résultat du test antibiogramme de *Pseudomonas aeruginosa*.

Ces antibiogrammes sont réalisés afin de mettre en évidence la résistance ou la sensibilité des divers souches étudiées dans ce travail, et sont donc considérés comme témoins de l'activité antibactérienne de *Pulicaria crista*.

6. Activités biologiques de *Pulicaria crista*

6.1. Activité antibactérienne

Cette activité a été testée à partir des résultats obtenus de la première extraction (phase liquide et phase solide) et de la deuxième extraction (phase liquide), sur les souches de référence et les souches cliniques. En raison du faible rendement en huile essentielle de notre matrice végétale, deux souches uniquement ont été testées (*Staphylococcus aureus* MuSo mecA et *Bacillus cereus* ATCC 10876).

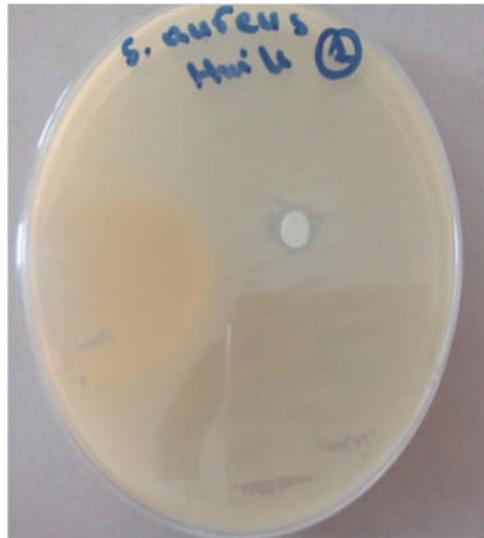
Les résultats sont consignés dans le tableau suivant et illustrés dans la figure 35:

Tableau 12 : Résultats de l'activité antibactérienne des extraits de *Pulicaria crista*.

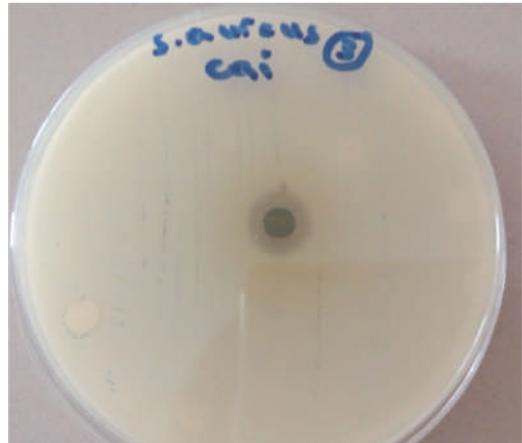
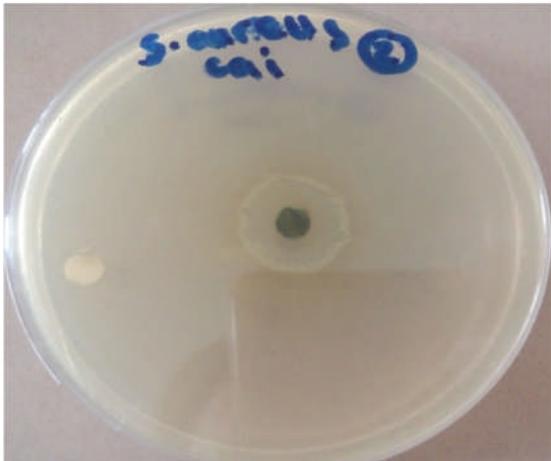
Origine des souches	Souches	Première extraction		Deuxième extraction (mm)	Huile essentielle (mm)	DMSO (mm)
		Phase liquide (mm)	Phase solide (mm)			
SOUCHES DE REFERENCES	<i>Staphylococcus aureus</i> MuSo mecA	0	13.23	8	9.95	0
	<i>Staphylococcus aureus</i> LGA 251 SARM mec C	0	17.34	14.79	/	0
	<i>Staphylococcus aureus</i> 25923	0	10.55	10.20	/	0
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	0	18.01	12.62	/	0
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	11.39	18.07	11	7.75	0
	<i>Eterococcus feacalis</i> WDCM 00009	0	10.50	0	/	0
SOUCHES CLINIQUES	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (1)	0	/	0	/	0
	<i>K. pneumoniae</i> (2)	0	/	12	/	0
	<i>K. pneumoniae</i> (3)	0	/	10	/	0
	<i>K. pneumoniae</i> (4)	0	/	10.11	/	0
	<i>K. pneumoniae</i> (5)	0	/	0	/	0
	<i>E.coli</i> (urinaire)	0	/	7	/	0
	<i>E.coli</i> (pus)	0	/	0	/	0
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	/	0	/	0

/ : test non effectué

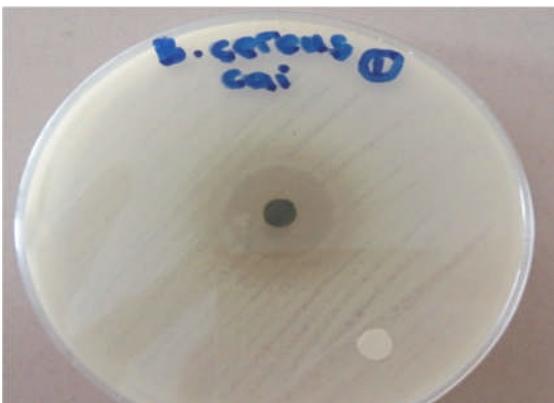
0 : 0mm



Staphylococcus aureus MuSo mecA



Staphylococcus aureus 25923



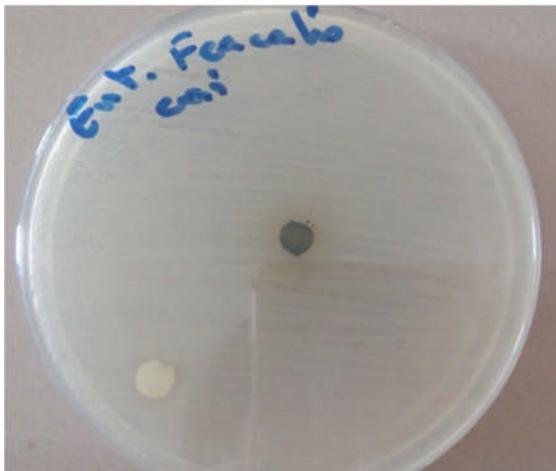
Bacillus cereus ATCC 14579



Bacillus cereus ATCC 10876



Bacillus cereus ATCC 10876



Eterococcus feacalis WDCM 00009

Figure 35 : Résultats du test de la phase solide (cai), de la phase solide (Ext) et de l'huile essentielle (Huile).

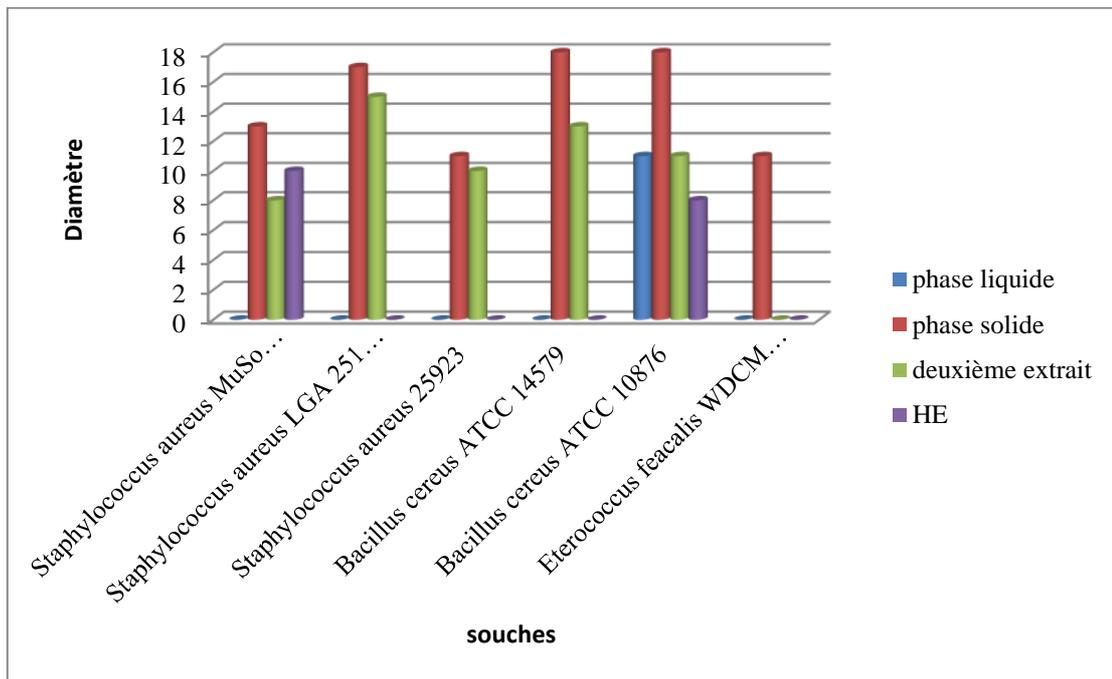


Figure 36 : Effet inhibiteur des différents extraits sur les souches de référence.

L'activité des produits de la 1^{ère} extraction est différente entre la phase solide et liquide. L'activité de l'extrait solide est nettement supérieure à celle de l'extrait liquide sur toutes les souches testées, avec des diamètres d'inhibition allant de 10 à 18 mm pour les souches de référence comparant à la présence d'une seule zone d'inhibition de 11.39 mm de diamètre à l'encontre de *Bacillus cereus* ATCC pour la phase liquide. Cela serait lié à la forte concentration des polyphénols dans la phase solide.

L'activité de la seconde extraction manifeste aussi une efficacité vis-à-vis des souches testées avec des diamètres d'inhibition allant de 8 à 14.75 mm pour les *Staphylococcus*, de 11 à 12.62 mm pour les *Bacillus* et de 10 à 12mm pour trois souches de *Klebsiella* (2,3 et 4). Il apparaît que cette activité est moins significative que celle de l'extrait solide. Cette différence serait liée à l'origine de la poudre qui est la plante non fleurie, donnant un résultat faiblement concentré en polyphénols

Les souches testées avec l'huile essentielle ont donné un diamètre d'inhibition de 9.95 mm pour *Staphylococcus aureus* MuSo mecA et de 7.75 mm pour *Bacillus cereus* ATCC 10876. Ces résultats se rapprochent de ceux trouvés avec la deuxième extraction pour les

mêmes souches, et clairement inférieurs à ceux de la phase solide pour les mêmes souches également.

D'après les résultats de notre étude et celle de Qaid M. AL. Hajj *et al.*, (2017), l'HE de *Pulicaria crista* ne possède pas un effet inhibiteur très important sur les souches testées (ex. : 10.27 ± 0.12 mm pour *S. aureus*) en comparaison à l'HE d'une plante du même genre *Pulicaria inuloides* testées sur les mêmes souches (ex. : 32 ± 0 mm pour *S. aureus*).

L'HE de la sciure du bois de loupe du Thuya a été testé sur la souche *S. aureus* qui a montré une grande sensibilité avec un diamètre de 20 mm. Les mêmes travaux ont conclu que l'effet des huiles essentielles sur cette souche est juste bactériostatique, puisque elles inhibent leur croissance (AKBLI *et al.*, 2016).

Les résultats obtenus à partir de l'activité de l'extrait méthanolique sont comparés à, ceux trouvés par FOUDAH *et al.*, (2015), le diamètre d'inhibition de *K. pneumoniae* est de 28 mm et de 22 mm pour *E. coli*, ces zones sont supérieures à celles qu'on a obtenu pour les mêmes souches. Les zones d'inhibition de *S. aureus* que nous avons obtenu sont, par contre, plus importantes que celles trouvées par le même auteur, qui sont non considérables (≤ 8).

Une autre étude menée par CHAIB *et al.*, (2015) a montré une inhibition de l'extrait phénolique sur les souches de *K. pneumoniae* avec un diamètre d'inhibition 13 mm.

Les travaux de HAMID YOUSFI (2015) menés en Rugia, rapportent que l'extrait de la plante étudiée a donné des zones d'inhibition élevées contre *Staphylococcus*, *Bacillus* et *Escherichia coli* de 29, 25 et 26 mm respectivement, et une zone d'inhibition intermédiaire contre *Pseudomonas* de 17 mm.

La différence de sensibilité des microorganismes aux différents extraits pourrait être attribuée à des variations des taux de pénétration des constituants des extraits à travers la paroi et la membrane cellulaire.

L'activité de l'huile essentielle est liée étroitement à sa composition chimique. Toutefois, il est probable que cette activité dépend aussi de composés minoritaires qui agissent d'une manière synergique (DEFERERA *et al.*, 2008).

L'activité antimicrobienne de la famille de composés phénoliques est due à leur structure (noyau aromatique lié au groupement hydroxyle dans différentes positions). Cette structure leur permet de former des liaisons hydrogène avec les groupes -SH dans les sites actifs des enzymes cibles, ce qui entraîne la désactivation de ces enzymes microbiens (ULTEE *et al.*, 2002).

Les terpènes phénoliques agissent aussi en se fixant sur les groupes amines et hydroxylamines des protéines membranaires de la cellule microbienne en provoquant

l'altération de la perméabilité et la fuite de contenus intracellulaires (LOPEZ-MALO *et al.*, 2005).

6.1.1. Concentration minimale inhibitrice

Les CMI ont été réalisées uniquement à partir de la deuxième extraction, sur des souches à Gram positif (*Bacillus*, *Enterococcus* et *Staphylococcus*) et à Gram négatif (*E. coli*, *Pseudomonas* et *Klebsiella*).

Tableau 13 : Résultats des tests des extraits sur les souches étudiées.

Origines des souches	Souches	Diamètre des zones d'inhibition (mm)				
		SM	1/2	1/4	1/8	1/16
Souches de référence	<i>Staphylococcus aureus</i> (MuSo mec A SARM)	8	7	0	0	0
	<i>S. aureus</i> (LG A251 SARM mec C)	14.79	9.61	7.88	6.57	0
	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	10.20	0	0	0	0
	<i>Bacillus cereus</i> (ATCC 14579)	12.62	7.72	7	0	0
	<i>B. cereus</i> (ATCC 10876)	11	7	0	0	0
	<i>Enterococcus faecalis</i> (WDCM 00009)	0	0	0	0	0
Souches cliniques	<i>E.coli</i> (infection urinaire)	0	0	0	0	0
	<i>E.coli</i> (pus)	0	0	0	0	0
	<i>Candida albicans</i> (squame)	0	0	0	0	0
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (1)	0	0	0	0	0
	<i>K. pneumoniae</i> (2)	12	10	8.60	0	0
	<i>K. pneumoniae</i> (3)	10	9.5	8.20	7	0

Résultats et discussion

	<i>K. pneumoniae</i> (4)	10.11	9.73	8	7	0
	<i>K. pneumoniae</i> (5)	0	0	0	0	0

La détermination des CMI a mis en évidence des niveaux d'action de l'extrait variables selon les souches. Cette étude a marqué une limite d'inhibition au niveau de la dilution 1/4 pour les souches *K. pneumoniae* (2), (3) et (4) avec des diamètres d'inhibition de 8.60 mm, 8.20 mm et 8mm respectivement. La limite d'inhibition de *S. aureus* (LG A251 SARM mec C) est marquée à la dilution 1/2 avec un diamètre de 9.61 mm. Pour ce qui concerne les souches *S.aureus* (MuSo mec A SARM), *S. aureus* (ATCC 25923), *B. cereus* (ATCC 14579) et *B.cereus* (ATCC 10876) leurs CMI représentent la concentration de la solution mère avec des diamètres d'inhibition de 8 mm, 10.20 mm, 12.62 mm et de 11mm respectivement.

6.2. Activité antifongique

Le test de l'activité contre la levure *C. albicans* a montré une résistance vis-à-vis du 2^{ème} extrait tout comme envers l'antifongique utilisé. (voire Annexe).

Le même extrait testé sur la moisissure a donné des résultats positifs, ces résultats sont classés dans le tableau 14 et illustrés par la figure 37 et 38 :

Tableau 14 : Diamètres des zones d'évolution d'*Aspergillus niger* en présence et en absence du 2ème extrait méthanolique.

durée d'incubation (hrs)	24	48	72	96	120
témoin (-) (mm)	0	50	90	90	90
témoin(+) (mm)	0	22	47	60	62

hrs = heures, mm = millimètre.

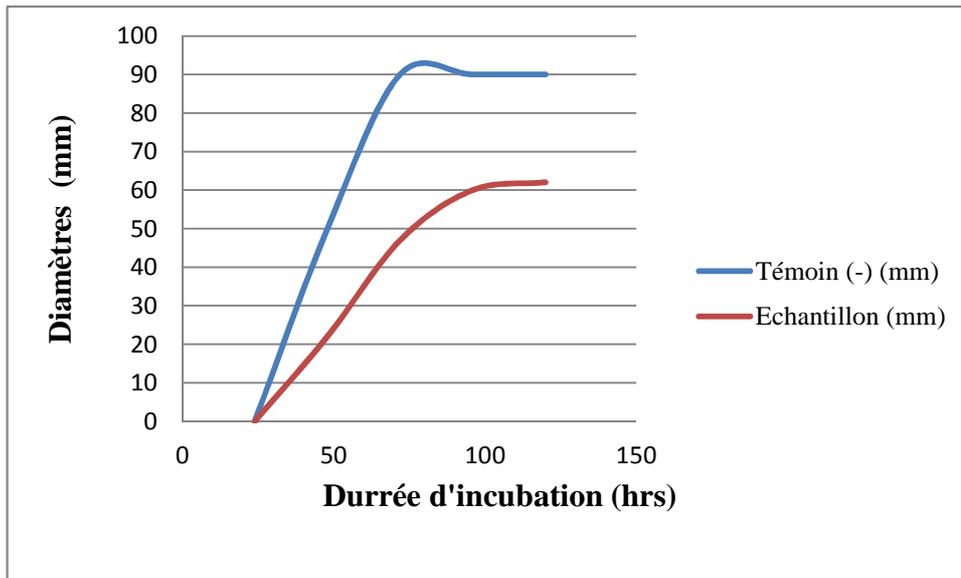


Figure 37 : Evolution de la moisissure en présence et en absence de l'extrait.

mm = millimètre, hrs = heures.



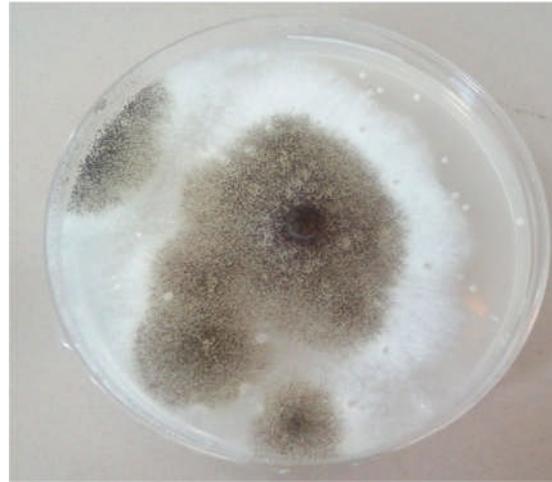
Témoin (-)



Culture après 48hrs



Culture après 72hrs



Culture après 96hrs

Figures 38 : Test de l'activité de l'extrait sur *Aspergillus niger*.

D'après nos résultats, on remarque que l'extrait influence sur le développement de la moisissure. Le témoin négatif a atteint un diamètre de développement maximal de 90mm au bout de 72 heures d'incubation à 28°C, tandis que le témoin positif n'a atteint que 62mm comme diamètre de développement maximal après 120 heures d'incubation à 28°C.

FOUDAH *et al.*,(2015) rapportent que l'extrait méthanolique de *Pulicaria crista* a un effet inhibiteur relativement moins important sur *Aspergillus niger* (18mm) que l'antibiotique standard (23mm)(ampicilline).

Ces mêmes travaux montrent l'action inhibitrice sur *Conidia albicans* avec un diamètre d'inhibition de 24mm comparant au standard de 27 mm de diamètre, ce qui signifie que la plante n'agit pas considérablement sur cette levure.

6.3. Activité antibiofilm

Un test de formation de biofilm sur quelques bactéries étudiées a été effectué, et trois d'entre elles sont sélectionnées suite aux résultats suivant :

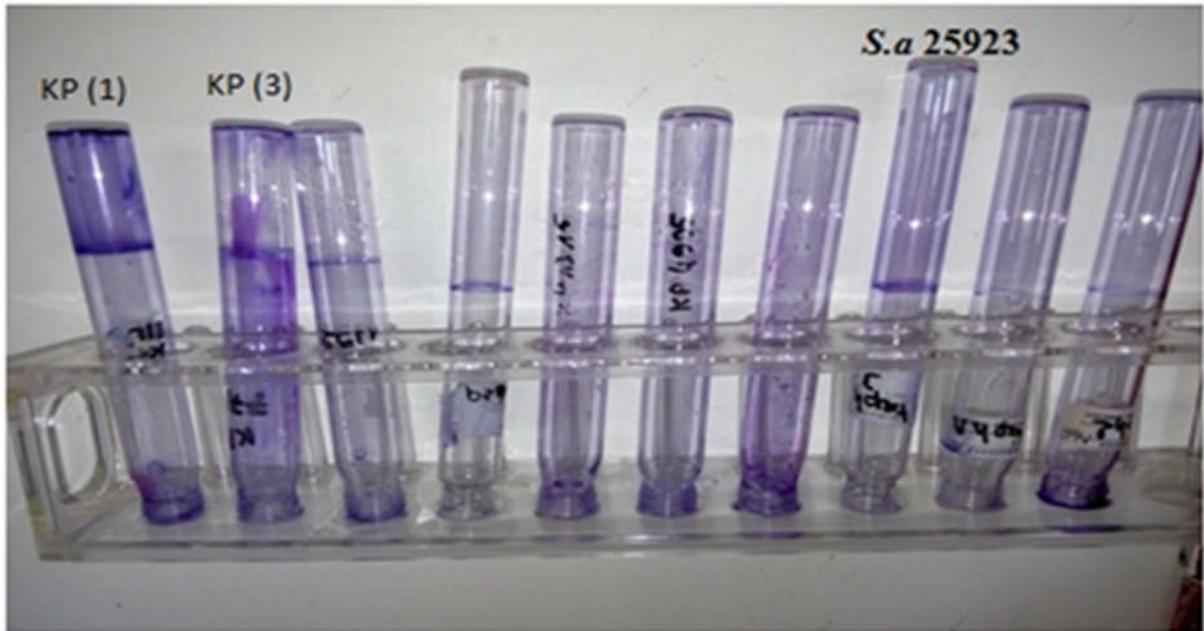


Figure 39 : Test montrant la formation de biofilm par les souches *K.pneumonia*(1), *K.pneumoniae* (3) et *S. aureus* 25923.

Après ensemencement, incubation et coloration de la plaque, le résultat de l'inhibition du biofilm est exprimé en fonction de l'intensité de la coloration. La couleur intense des puits signifie la présence du biofilm et leur clarté signifie une inhibition plus ou moins importante du biofilm.

Après séchage de la plaque à l'étuve, on a effectué une lecture à l'aide d'un lecteur de plaque Elisa à la longueur d'onde 590 nm. Les résultats sont consignés dans le tableau 15.



Figure 40 : Résultat de la coloration au violet de Gentiane.

D'après cette figure on peut clairement constater la différence de la charge des puits en biofilms. Cette différence de charge est due à l'action inhibitrice de l'extrait vis-à-vis des biofilms formés par toutes les souches testées.

Tableau 15 : DO de la plaque Elisa à 590 nm.

Souches	DO						
	SM	1/2	1/4	1/8	1/16	T+	T-
KP (1)	0.143	0.105	0.140	0.150	0.175	0.328	0.096
KP (3)	0,107	0.138	0.174	0.249	0.293	0.309	0.096
<i>S.aureus</i> 25923	0.124	0.165	0.167	0.173	0.197	0.274	0.094

Le tableau ci-dessus montre les différentes densités optiques obtenues en testant les souches sélectionnées avec les différentes concentrations de l'extrait. On remarque que les DO concordent avec les concentrations des dilutions, puisque les valeurs obtenues au niveau de la SM sont inférieures à celles obtenues à la dilution 1/2, et de même, les DO de cette dilution sont inférieures à celles de la 1/4 et ainsi de suite.

Cela voudrait dire que plus la concentration de l'extrait est élevée, plus la formation du biofilm est inhibée et donc la DO est faible.

L'étude menée par TANG *et al.*, (2014) a montré que l'extrait éthanolique de *Arctium lappa* de la famille des Asteraceae inhibe 40.9 à 100% de la formation de biofilm de *Staphylococcus aureus*.

Les résultats obtenus par SANCHEZ *et al.*, (2016) en testant l'effet inhibiteur de biofilm formé par *Staphylococcus aureus* de l'extrait méthanolique de *Gutierrezia microcephala* (Asteraceae) indiquent une inhibition relative aux concentrations des extraits.

On déduit alors que l'effet de l'extrait est dose-dépendant.

Cette inhibition serait liée à l'effet de l'extrait sur soit les capsules ou les pili aidant les bactéries à former leurs biofilms ou bien sur les bactéries elles mêmes.

*Conclusion et
perspectives*

Cette étude s'inscrit dans le cadre de mémoire de fin d'études, dont l'un des objectifs majeurs est la recherche de nouveaux principes actifs de plantes médicinales afin de valoriser la médecine traditionnelle et de remédier à la résistance des bactéries aux antibiotiques.

Ce travail se divise en deux principales parties :

Dans un premier temps, on a procédé à l'extraction des polyphénols par macération dans un solvant organique, suivant le procédé d'extraction solide-liquide. Le rendement des deux extractions effectuées diffère selon les parties végétales utilisées.

On a également réalisé l'extraction de l'huile essentielle à partir de la partie aérienne fleurie de la plante par la technique de la distillation par entraînement à la vapeur d'eau. Le rendement de l'HE extraite s'est révélé très faible et est de 7.10^{-3} %.

Enfin, l'analyse des phytoconstituants de *Pulicaria crispa* a révélé la présence en grande quantité des mucillages, des saponosides et des flavonoïdes.

Dans la seconde partie de cette étude, une évaluation des activités antibactériennes, antifongique et antibiofilm des extraits méthanoliques et de l'huile essentielle obtenus a été réalisée.

L'activité antibactérienne de l'HE a été appliquée sur deux souches de référence *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* dont les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés à 9.95 et 7.75 mm respectivement.

Un meilleur effet inhibiteur est alors noté pour la phase solide issue de la première extraction, avec des zones d'inhibition allant de 10.55 à 18.07 mm de diamètre à l'encontre des souches de référence. Suivi de l'activité inhibitrice de la deuxième extraction avec des diamètres variant entre 8 et 14.79 mm de diamètre vis-à-vis de toutes les souches bactériennes testées. Cependant la phase liquide du premier extrait n'a aucun effet inhibiteur sur les bactéries, hormis *Bacillus cereus* ATCC 10876.

L'activité antifongique est réalisée à partir du deuxième extrait sur *Aspergillus niger* et *Candida albicans*. Ce test a montré un résultat fructueux sur la moisissure, contrairement à *Candida* qui s'est montré résistant.

Ce même extrait a été testé sur les bactéries formatrices de biofilm en se référant à la technique de la CMI sur microplaque. D'après les résultats obtenus, on remarque que l'épaisseur du biofilm est d'autant plus faible que la concentration de l'extrait est importante.

En conclusion, les extraits de *Pulicaria crispa* possèdent des activités assez intéressantes sur les bactéries ainsi que sur les champignons testés. Il a été constaté que ces activités varient en fonction des souches microbiennes, du type de l'extrait et de la partie de la plante utilisée pour cet effet.

Ces caractéristiques importantes font de la plante *Pulicaria crispa* un patrimoine à préserver et à valoriser.

Perspectives

A vu des résultats des tests obtenus avec l'huile essentielle et les extraits phénoliques de *Pulicaria crispa*, nous proposons d'étendre cette études vers de meilleurs procédés d'extraction des HEs pour un meilleurs rendement.

On propose aussi d'opter pour la diversification des extraits à base de différents solvants afin de sélectionner et les meilleurs rendements et le meilleur effet biologique.

Les composants photochimiques de cette plante peuvent aussi être très actifs contre les phénomènes d'oxydation et d'inflammation.

L'activité antitumorale de cette plante n'est également pas à négliger qui, d'après la littérature, serait l'une des rares armes de lutte contre cette maladie du siècle. Cette priorité inclue les autres espèces du genre *Pulicaria*.

Enfin, nous estimons important de donner une valeur économique pour les résultats des études orientées vers ce sens pour leurs innombrables qualités.

Références bibliographiques

A /

- **ACHAT S. (2013).** Polyphénols de l'alimentation extraction, pouvoir antioxydant et extraction avec des ions métallique. Thèse de doctorat. Université de A. MIRA. Béjaia.
- **ADEBIYI A., BASSEY E.E., AYO R., BELLO I., HABILA J. ET ISHAKU G.A. (2016).** Anti-mycobacterial, Antimicrobial and Phytochemical Evaluation of *Pulicaria crispa* and *Scoparia dulcis* Plant Extracts. *Journal of Advances in Medical and Pharmaceutical Sciences.* 7(4): 1-11.
- **AGUILERA-CARBO A., AUGUR C., PRADO-BARRAGAN L. A., FAVELATORRES E., AGUILAR C N. (2008).** Microbial production of ellagic acid and biodégradation of ellagitannins. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 78: 189-199
- **AKBLI M., RHALHABI N., AIT MHAND R., AKSSIRA M. et MELLOUKI F. (2016).** Activié antibacterienne de l'huile essentielle de la sciure du bois de loupe de
- **ALNOUR AA. (2007).** Potency of *Pulicaria crispa* (forssk.) oliv. (asteraceae) on *bulinus truncatus* host snails of schistosomes. Thèse de doctorat de philosophie en biologie. Université de Kartoum.
- **AYAN M., KUZUCU C., DURMAZ R., AKTAS E. et CIZMECI Z. (2003).** Analysis of three outbreaks due to *Klebsiella* species in a neonatal intensive care unit. ;24(7):495-500.

B/

- **BEDI G., TONZIBO Z.F., OUSSOU K.R., CHOPPARD C., MAHY J.P. et N'GUESSAN T.Y. (2010).** Effect of essential oil of *Chromoleana odorata* (Asteraceae) from Ivory Coast, on cyclooxygenase function of prostagladin-H synthase activity. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 4(8) : 535-538.
- **BELAICHE P. (1979).** Traité de Phytothérapie et d Aromathérapie. Tome II: Maladies Infectieuses. Editions Maloine, Paris.
- **BENABDELKADER T. (2012).** Biodiversité, bioactivité et biosynthèse des composés térpéniques volatils des Lavandes Ailées, *Lavandula stoechas Sensu Lato*, un complexe d'espèces méditerranéennes d'intérêt pharmacologique. Thèse de doctorat en biologie et ecophysiologie végétale. Ecole normale supérieure, Kouba. Alger.
- **BENAYAD N. (2008).** Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines : moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées. Université Mohammed V. Agdal. Rabat, 63p.

- **BENJILALI B. (2004).** Extraction des plantes aromatiques et médicinales cas particulier de l'entraînement à la vapeur d'eau et ses équipements. Manuel pratique. Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation. 17-59.
- **BOTTEREL F., FAIBIS F., CHEVALIER C., DELISSE C., FIACRE A., DUBOIS A., DEMACHY M.C. (2004).** Intérêts et limites de la surveillance des infections nosocomiales à partir du laboratoire de microbiologie : expérience du CHG de Meaux. *Pathologie Biologie*. 52 : 469–473.
- **BOUCARD G.R. and SERTH R.W. (1998).** Continuous steam distillation of essential oil. *Perfumer and Flavours*. Volume 23, pp : 1-5.
- **BOURWOLF S., GEFFERS C., et BEHNKE M. (2002).** Correlation between transmissions and the nosocomial infection rate in five different intensive care units in a German University Hospital. *Journal of Hospital Infection*. 62(2): 181-186.
- **BRIAN M.L. (1995).** The isolation of aromatic materials from plant products. R.J. Reynolds Tobacco Company. Winston- Salem (USA), pp : 57-148.
- **BRIANTE R., PATUMIB M., FEBBRIOA F., NUCCIA R. (2004).** Production of highly purified hydroxytyrosol from *Olea europaea* leaf extract biotransformed hyperthermophilie Bglucosidase. *Journal of Biothechnology*. 111(01): 67-77.
- **BRUNETON J. (1999).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3ème édition, Ed. TEC et DOC, Paris.
- **BRUNETON J. (2008).** Acides phénols. In: Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. *Ed: Tec & Doc. Lavoisier, Paris*. pp : 198-260.
- **BRUNETON J. (2009).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Eds Tec&Doc 4ème éd. 1269p
- **BURT S. (2004).** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. *International Journal of Food and Microbiology*.94(3):223-53.

C/

- **CALSAMIGLIA S., BUSQUET M., CARDOZOP.W., CASTILLEJOS L. et FERRET A. (2007).** Essential oils for modifying rumen fermentation. 90:2580-2595.
- Centre national de référence des streptocoques (CNR-Strep), service de bactériologie, hôpital saint vincent-de-paul, 74-82, avenue denfert-rochereau, 75014 Paris, France.

- **CHAIB F., SAHKI R., SABAOU N., RACHED W. et BANNACEUR M. (2015).** Phytochemical investigation and biological activities of some saharian plants from Hagar. *Journal of Agricultural Science*. 7(7) : 1916-9752.
- **CHAICHAT J.K., CARRY L. P., MENUT C., LAMATY G., MALHURET R., CHOPINEAU J. (1997):** Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. VI. Activity of some African essential oils. *Journal of Essential Oil Research*. 9 (1) : 67-75.
- **CHAUDHARY S.A. (2000).** In: Flora of the kingdom of saudi arabia (Part 3), vol. 2. Ministry of Agriculture and Water, Riyadh, Saudi Arabia, pp : 432.
- **CHAVANE U.D., SHAHIDI F. et NACZK M. (2001).** Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus L*) as affected by different solvents. *Journal of Food and Chemistry*. 75 : 509-512.
- **CHEHMA A. (2006).** Catalogue des plantes spontanées du Sahara septentrional Algérien. Laboratoire de protection des écosystèmes en zones arides et semi aride . Edition Dar El Houda. ISBN : 9947-0-1312-X. 146 p.
- **CHEHMA A. et DJEBAR M.R. (2008).** Les espèces médicinales spontanées du Sahara septentrional algérien : distribution spatio-temporelle et étude ethnobotanique. *Revue Synthèse*. Université Badji Mokhtar, Annaba. 17: 94 – 99.
- **CHEHMA A. (2011).** Caractéristiques floristiques et nutritionnelles faces aux variations climatiques. CMEP TASSILI (N° 09 MDU 754).
- **CHEHMA A., DJEBAR M.R., HADJAJI F. et ROUABEH L.(2005).** Etude floristique spatiotemporelle des parcours sahariens du Sud-Est Algérien. *Revue Sécheresse*, 16 (4) : 275-285.
- **CHEHMA A., FAYE B. et DJEBBAR M.R.(2008).** Productivité fourragère et capacité de charge des parcours camélins du Sahara septentrional algérien. *Sécheresse*. 19 (2) : 115-121.
- **CHHETRI KB. ,AWADH AN. et SETZER WN.(2015).** A survey of chemical compositions and biological activities of Yemeni aromatic medicinal plants. 2, 67-92; doi:10.3390.
- **CHIRA K., SUCH J., SAUCIER C., TEISSEDRE L. (2008).** Les polyphénols du raisin. *Ed. Springer*. 6 :75-82.

- **CHRISTENSEN G.D., SIMPSON W.A., BISNO A.L. and BEACHEY E.H. (1989).** Adherence of shime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infectiology – Immunology*.37 : 318-326.
- **COWAN M.M. (1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology*. 12 : 564-582.

D/

- **D'ARCHIVIO M., FILESI C., DI BENEDETTO R., GARGIULO R., GIOVANNINI C. ET MASELLA R. (2007).** Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali-dellIstituto-Superiore-di-Sanità*. 43(4) :348-361.
- **DALI Y.M.K. (2017).** Etude phytochimique bioguidée de plantes aromatiques sahariennes. Thèse de doctorat. Université Abou Bekr Belkaïd . Tlemcen.
- **DEFERERA D.J., ZIOGAS B.N. et POLISSIOU M.G. (2000).** *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 48(6) : 2576-2581.
- **DESCHEPPER R. (2017).** Variabilité de la composition des huiles essentielles et interet de la notion de chémotype en aromathérapie. Thèse de doctorat. Faculté de pharmacie de Marseille.
- **DESCHEPPER R. (2017).** Variabilité de la composition des huiles essentielles et intérêt de la notion de chémotype en aromathérapie. *Sciences Pharmaceutiques*. Thèse de doctorat.
- **DOLATOWSKI Z. J., STADNIK J. et STASIAK D. (2007).** Applications of ultrasound in food technology. *ACTA Scientiarum Polonorum*. 63(6) : 89–99.
- **DONG Y. PRUYNE D. et BRETSCHER A. (2003).** Comparison between tavo *Klebsiella* : the plant endophyt *K. pneumoniae* 342 and chimical isolate *k. pneumonia* MGH 78578. *J. Symbiosis*. 35: 247-259.
- **DRUZYNK A., STEPNIIEWSKA A. et WOLOSIAK R. (2007).** The influence of time and type of solvent on efficiency of the extraction of polyphenols from green tea and antioxidant properties obtained extracts. *Acta Scientarum Polonorum Technologia Alimentaria*. 6: 27-36.
- **DRUZYNK A., STEPNIIEWSKA A. et WOLOSIAK R. (2007).** The influence of time and type of solvent on efficiency of the extraction of polyphenols from green tea and antioxidant properties obtained extracts. *Acta Scientarum Polonorum Technologia Alimentaria*. 6: 27-36.

- **DURARFORD C., D'HERVICOURT L. et LAPRAZA J.C. (1999).** Cahier de phytothérapie clinique.1. Examens de laboratoires galliniques. Elements thérapeutiques synergiques. 2^{ème} édition. MASSON. Paris.

E/

- **SANCHEZ E., MORALES C.R., CASTILLO S., LEOS-RIVAS C., GARCIA-BECERRA L. et ORTIZ MARTINEZ D.M. (2016).** Antibacterial and Antibiofilm Activity of Methanolic Plant Extracts against Nosocomial Microorganisms. Article ID 1572697, 8 p.
- **EL-EGAMI A.A. (1989).** Studies on volatile oils of Pulicaria herbs. M.Sc. thesis. Faculty of Agriculture, University of Khartoum, Sudan.

F/

- **FABIAN D., SABOL M., DOMARACKA K. et BUJNAKOVA D. (2006).** Essential oils--their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and effect on intestinal cell viability. 20(8):1435-45
- **FALLEH H., KSOURI R., CHAIB K., KARRAY-BOURAOUI N., TRABELSI N. et al., (2008).** Phenolic composition of *Cynara cardunculus L.* organs, and their biological activities. *Compt. Rend. Biol.* Vol. 331. pp : 372-379.
- **FERNANDEZ X. et CHEMAT F. (2017).** La chimie des huiles essentielles. Tradition et innovation. Edition Vuibert. 288 p.
- **FOUDAH A.I., AFTAB A., SOLIMAN A.G., SALKINI M.A., ELMOUSTASIM O.I. et al., (2015).** Pharmacognostical, antioxydant and antimicrobial studies of aerial part of *Pulicaria crispa* (Family : Asteraceae).
- **FRANCHOMME P. et PENOEL D.(1990).** L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Edition Roger Jollois. 446p.
- **FRITZ-H K. BÖTTGER E.C. ZINKERNAGEL R.M. HALLE O. (2008).** Manuel de poche de microbiologie médicale. Médecine Sciences Publications.

G/

- **GHEDIRA K. (2005).** Les flavonoïdes: structures, propriétés biologiques, rôles prophylactiques et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*. 04: 162-169.
- **GHESTEM A., SEGUIN E., PARIS M., et ORECCHIONI A.M. (2001).** Le préparateur en pharmacie. Dossier 2. Editions TEC&DOC. Paris. 275p.
- **GOLLER C.C. et ROMEO T. (2008).** Environmental influences on biofilm development. In *Bacterial biofilms*. Ed. Springer Berlin Heidelberg, pp : 37-66.
- **GONZALEZ-GALLEGO J., GARCIA-MEDIAVILLA M.V., SANCHEZ-CAMPOS S., TUNON M.J. (2010).** Fruit polyphenols, immunity and inflammation. *British Journal of Nutrition*. 104: S15-S27.
- **GRASTEAU A. (2011).** Sélection de mutations affectant la formation de biofilm chez *Actinobacillus pleuropneumoniae*. M.Sc en sciences vétérinaires. Université de Montréal.
- **GUIGNARD J.L. (2000).** Les composés aromatiques In : *Biochimie végétal*. Ed : Dunod. pp :161-217.
- **GUILLEMAN J., ROUSSEAU A., DELAVEAU P. (1989).** Neurodepressive effects of the essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. *Ann Pharm.Fr* 47(6):337-43.

H/

- **HAFIANE M.R. (2008).** Différentes méthodes de typage des souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées des patients atteints de mucoviscidose. *Medecine et Maladies Infectieuses*. 38 (5) : 238- 247.
- **HAMID YOUSFI M. (2015).** Dépistage phytochimique et activité antimicrobienne de l'extrait entier de plante de *Pulicaria crispa*.
- **HASSIOTIS C.N. (2010).** Chemical compounds and essential oil release through decomposition process from *Lavandula stoechas* in Mediterranean region. 38(4) : 463-864.
- **HOGAN S., ZHANG L., LI K., ZOECH LEIN B. et ZHOU K. (2009).** Antioxdant properties and bioactive components of Norton (*Vitis aestivalis*) and Calsernet franc (*Vitis vinifera*) wine graps, *LWT. Food Science and Technology*.42 : 1269-1274.
- **HONG S.S., HWANG J.S., LEE M.K., HWANG B.Y., RO J.S. (2007).** Monoamine oxidase inhibitory components from *Cayratia japonica*. *Archives Pharmacal Research*. 30:07-13
- **HUETE A. (2012).** Huiles essentielles pour tous les jours. Editions Artémis, 223p.

- **HYNES M.J. et O'COINCEANAINN M. (2004).** The kinetics and mechanisms of reactions of iron(III) with caffeic acid, chlorogenic acid, sinapic acid, ferulic acid and naringin. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 98: 1457–1464.
- **HYNES M.J., O'COINCEANAINN M. (2001).** The kinetics and mechanisms of the reaction of iron (III) with gallic acid, gallic acid methyl ester and catechin. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 85: 131–142.
- **HE Z., XIA W. et CHEN J. (2008).** Isolation and structure elucidation of phénolics compounds in Chinese olive (*Cnarium album L.*) fruit. *European Food Research and Technology*. 226:1191-1196.

J/

- **JANSSEN A.M., SCHEFFER J.J.C., PARHAN-VAN ATTEN A.W., BAERHEIM SVENDSEN A. (1988).** Screening of some essential oils for their activities on dermatophytes. *Pharm weekblad Ed*, 10 (6): 277-280.

K/

- **KHENAKA K. (2011).** Effet de diverses plantes médicinales et de leurs huiles essentielles sur la méthanogénèse ruminale chez l'ovin. Diplôme de Magister. Université Mentouri Constantine.

L/

- **LAGUNEZ RIVERA L. (2006).** Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffe par induction thermomagnétique directe. Thèse de doctorat. Institut national polytechnique de Toulouse.
- **LANGLEY J.M. HANAKOWSKI M. et LEBLANC J.C. (2001).** Unique epidemiology of nosocomial urinary tract infection in children. 29(2):94-8.
- **LAVIGNE J.P. (2014).** Cours *Escherichia coli*. DFGM S₂. Infectieux. Université de Montpellier.
- **LE HOUEROU H.N., (1990).** Définitions et limites bioclimatiques du Sahara. *Sécheresse*, 1 : 246-259.
- **LINDEN ET LORIENT D. (1994).** Pigments et arômes .In : Biochimie agro-industrielle valorisation alimentaire de la production agricole. *Ed : Masson*. 338-340.

- **LONG H.S., TILNEY P.M., VAN WYK B.E. (2010).** The ethnobotany and pharmacognosy of *Olea europaea* subsp. *africana* (Oleaceae). *South African Journal of Botany*. 76 (02): 167-420.
- **LOPEZ-MALO A., ALZAMORA S.M. et PALOU E. (2005).** *International Journal of Food and Microbiology*. 99 : 119-128.
- **LYATIM S. (2008).** Moisissures d'intérêt médical. Etude récente prospective au laboratoire de parasitologie et mycologie à l'hôpital d'enfants de rabat : a propos de 133 prélèvements. Thèse de doctorat. Université Mohammed V de Rabat. Maroc.

M/

- **MANACH C., SCALBERT A., MORAND C., REMESY C., JIMENEZ L. (2004).** Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*. 79: 727-747.
- **MANACH C., SCALBERT A., MORAND C., REMESY C., JIMENEZ L. (2004).** Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*. 79: 727-747.
- **MATHUR T., SINGHAL S., UPADHYAY D.J., FATMA T. et RATTAN A. (2006).** Detection of biofilm formation among the clinical isolates of Staphylococci : An evaluation of three different screening methods. *Indian Journal of Medicine and Microbiology*. 2 (1) : 25-29.
- **MAYER F. (2012).** Utilisations thérapeutiques des huiles essentielles : étude de cas en maison de retraite. Diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université de Lorraine.
- **MBAREK L.A., MOUSE H.A., ELABBADI N., BENSALAH A. M., GAMOUH A. et al., (2007).** Anti-tumor properties of blackseed (*Nigella sativa* L.) extracts. *Brazilien Journal of Medicinal and Biological Research*.40: 839-847.
- **MEBARKA L.(2008).** Contribution à l'étude de la composition chimique et de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Tinguarra sicula* (L.) Parl. et de *Filipendula hexapetala* Gibb. Diplôme de magister en Biologie et Physiologie Végétale. Université Ferhat Abbas-Setif.
- **MICOL V., CATURIA N., PEREZ-FONS L., MAS V., PEREZ L., ESTEPA A. (2005).** The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia Rhadovirus (VHSV). *Antiviral Research*. 66: 129-136.

- **MOTHANA R.,GRUENERT R.,BEDNARSKI P.J. et LINDEQUIST U.(2009).** Evaluation of the in vitro anticancer, antimicrobial and antioxidant activities of some Yemeni plants used in folk medicine. *Pharmazie* 64: 260–268.

N/

- **NAUCIEL C. et VILDE J.L. (2005).** Bactériologie médicale. 2^{ème} édition. Editions MASSON. Paris. 272p.
- **NAUCIEL C. et VILDE J.L. (2005).** Bactériologie médicale. Edition MASSON. Paris. pp : 5-15-47.
- **NEGRE R. (1962).** Petite flore des régions arides du Maroc occidental. *Centre national de la recherche scientifique*. Volume 2 pp :1961 – 982.

O/

- **OJEIL A., EL DARRA N., EL HAJJ Y., BOU MOUNCEF P., RICHARD G. et al. (2010).** Identification et caractérisation de composés phénoliques extraits du raisin Château KSARA. *Lebanese Science Journal*, Vol. 11. N° 2.
- **OSKAY M., OSKAY D. and KALYONCU F. (2009).** Activity of some plant extracts against multi-drug resistant human pathogens. *Iranien Journal of Pharlaceutical Research*. 8(4) : 293-300.
- **O'TOOLE G., KAPLAN HB., KOLTER R. (2000).** Biofilm formation as microbial developement. *Annu Rev Microbiol*; 54:49-79.
- **OZENDA P. (2004).** Flore et végétation du Sahara. 3^{ème} édition.Ed. C.N.R.S. Paris. 662p.

P/

- **PARIS M. et HURABEILLEN M. (1981).** Abrégé de Matière médicale, pharmacognosie. *Ed:Masson*. 210-215.
- **PARIS M. et HURABIELLE M. (1981).** Abrégé de matière médicale (pharmacognosie). Volume 1. Editions Masson. 339p.
- **PAULI A. (2001).** Antimicrobial properties of essential oil constituents. *International Journal of Aromatherapie* . 11(3):126–33.
- **PELERIN P. (1991).** Supercritical fluid extraction of natural saw materials for the flavor and perfume industry. *Perfum. Flavor* 16(4) : 37-39.

- **PETITET F. (2012).** Cartographie de l'espace chimique d'une large collection d'huiles essentielles-Visualisation en réseau. *Phytothérapie*. 10 :44-54.
- **PIOCHON M. (2008).** Etude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore laurentienne : composition chimique, activités pharmacologiques et hémisynthèse.
- **PONCE A.G., FRITZ R., DEL VALLE C.E. et ROURA S.I. (2003).** Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora organic swiss chard. *Lebensmited-wissenscharft und-technology*. 36 : 679-484.
- **Pradel A. (2016).** Description des infections urinaires à *Enterococcus faecalis* chez les enfants de moins de 16 ans. Médecine humaine et pathologie. Thèse de doctorat.

Q/

- **QAID M Al-Hajj N.,WANG H X.,MA C.,LOU Z.,BASHARI M. et THABIT R.(2014).** Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils of some aromatic medicinal plants (*Pulicaria inuloides*-Asteraceae and *Ocimum forskolei*-Lamiaceae).*Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13 (8): 1287-1293.
- **QAID M. AL. HAJJ N., ALGABR M.N., HUSNAIN R., THABIT R., ELFARGA A., ABOUGHORA W. et al., (2017).** Antibacterial activities of the essential oil of some aromatic medicinal plants to control pathogenic bacteria and extend the shelf-life of seafood. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 17: 181-191
- **QUATRESOUS N. (2011).** Aspergillose humaine. Epidemiologie, diagnostic biologique, contrôle. Thèse de doctorat. Université de Limoges.

R/

- **RAMDANE F. (2018).** Contribution à l'étude des activités biologiques de quelques plantes médicinales du Sahara algérien: *Nauplius graveolens*, *Ziziphus lotus* et *Capparis spinosa*. Thèse de doctorat. Université Kasdi Merbah Ouargla.
- **RICHARD K. (2005).** Génomique Fonctionnelle In Vivo De L'oxydoréductase Pa3498 Chez *Pseudomonas Aeruginosa*. Thèse de doctorat. Université Laval. Québec.
- **RICHTER G. (1993).** Composés phénoliques in Métabolisme des végétaux: physiologie et biochimie. *Ed Presse polytechnique et universitaire romande*. pp: 317-339.
- **ROUX D. (2008).** Conseil en aromathérapie. 2^{ème} édition. Ed. Walters Kluwer, p : 187.

S/

- **SARNI-MANCHADO P. et CHEYNIER V. (2006).** Les polyphénols en agroalimentaire. *Ed Tec et Doc Lavoisier*. pp : 02-11.
- **SCALBERT A., MANACH C., MORAND C., REMESY C., JIMENEZ L. (2005).** Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 45: 287-306.
- **SCHIFFERS H. (1971).** Die Sahara und ihre randgebiete. Ed Weltforum Verlags-Munchen, pp :674 .
- **SCHROWDER M.P. et MESSING A.M. (1949).** Methods for comparing the antibacterial activity of essential oil and other aqueous insoluble compounds. *Bull, Nat, Formulary Comm*. 17 : 213-218.
- **SEGAL S., ROLLE L., GERBI V., ORRIOLS I. (2008).** Phenolic ripness assessment of grape skin by texture analysis. *Journal of Food Composition and Analysis*. 21 :599-607.
- **SILVA S., GOMES L., LEITAO F., BRONSE M., CAELHO A.V. ET BOAS V. (2010).** Secoiridoids in olive seed: characterization of nüzhenide and 11-methyl oleosides by liquid chromatography with diode array and mass spectrometry. *Grassasy Aceittes*. 61 (02): 157-164.
- **SPENCER J.P. (2010).** Beyond antioxidants: the cellular and molecular interactions of flavonoids and how these underpin their actions on the brain. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 69: 244–260.
- **STEPANOVIC S., IRKOVIC´ I.C.,RANIN L. ET SVABIC´-VLAHOVIC M. (2004).** Biofilm formation by *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Letters in Applied Microbiology*. 38 : 428–432.

T/

- **TODAR K. PhD. (2018).** The normal bacterial flora of humans. *Biomedical physics and engineering express*, pp :1.

- **TOURE D. (2015).** Etudes chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques médicinales de côte d'ivoire. Thèse de doctorat. Université Félix Houphouët- Boigny du Cote d'Ivoire.

U/

- **ULTEE A., BENNIK M.H.J. et MOEZELAAR R. (2002).** The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Envir. Microb.* 68 (4) : 1561-1568.

V/

- **VEILLET S., TOMAO V. et CHEMAT F. (2010).** Ultrasounds assisted maceration: An original procedure for direct aromatisation of olive oil with basil. *Food Chemistry*. Volume 123. Issue 3, pp : 563-958.

W/

- **WAINSTEN , J.P. (2009).** Le Larousse medicale. Paris : Larousse.
- **WILLEM J.P. (2002).** Le guide des huiles essentielles pour vaincre les problèmes de santé : médecine d'avenir. Edition LMV. Paris.
- **WYLIE J.L. et NOWICKI D.L. (2005).** Molecular epidemiology of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Manitoba, Canada. *Journal of Clinical Microbiology*. 43(6):2830-6.

Y/

- **YUXIA T., LOU Z., TANVER RAHMAN M.R., QAID AL-HAJJ N. et WANG H. (2014).** Chemical Composition and Anti-Biofilm Activity of Burdock (*Arctium lappa* L. Asteraceae) Leaf Fractions against *Staphylococcus aureus*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 13 (11): 1933-1939.

Z/

- **ZOGHET M.F. et AL-ALSHEIKH A. (1999).** Wild plants in the region of riyadh. King saud university press, Riyadh, Saudi Arabia, pp: 194-195.

Sites web :

<https://ca.wikipedia.org>

<https://f.r.wikipedia.org>

<https://microbwiki.kenyon.edu>

<https://www.alilamedicalimage.com>

<https://www.pinterest.com>

[www.biotrans.uni.wroc..pl](http://www.biotrans.uni.wroc.pl)

www.gastroscan.ru

www.gastroscan.ru

Annexes

Annexe 1**Composition des milieux de culture utilisés**

- Bouillon Brain Heart Infusion (BHIB)
 - Infusion de cœur de bœuf5g
 - Infusion de cervelle de veau..... 12,5g
 - Protéose-Peptone..... 10g
 - Glucose2g
 - Chlorure de sodium5g
 - Phosphate disodique2,5g
 - pH final 7.4
 - Répartir dans des tubes à essai puis autoclaver à 120°C.

- Bouillon Tryptone Soja (TSB)
 - Hydrolysate enzymatique de caséine17g/L
 - Peptone de soja3g/L
 - D-Glucose2.5g/L
 - NaCl5g/L
 - Hydrogénophosphate dipotassique2.5g/L
 - Ajuster à pH=7.4 et stériliser.

- Eau physiologique
 - Eau distillée1L
 - NaCl..... 9g
 - Répartir dans des flacons propres et stériliser à 120°C.

- Gélose dextrosée à la pomme de terre (PDA)
 - Pomme de terre..... 200g
 - Dextrose ou sucre blanc de cannes..... 15g
 - Agar20g
 - Eau distillée1L
 - Remplir des flacons propres et stériliser à 120°C.

➤ Géllose nutritive (GN)

- Extrait de viande3g/L
- Extrait de levure3g/L
- Peptone..... 10g/L
- NaCl..... 5g/L
- Agar18g/L
- pH ajusté à 7.4 puis stérilisé à 120°C.

➤ Mueller-Hinton (MH)

- Extrait de viande..... 3g/L
- Amidon1.5g/L
- Hydrolysate acide de caséine..... 17.4 g/L
- NaCl..... 40g/L
- Agar..... 16g/L
- Ajuster le pH à 7.4 puis autoclaver à 120°C.

➤ Sabouraud

- Peptone.....10g
- Glucose massé.....20 g
- Agar-agar..... 15 g
- Eau distillée1L
- Vitamines et facteurs de croissance
- Ajuster le pH à 6.0 et passer à l'autoclave à 120°C.

Annexe 2

Généralités sur les germes étudiés

Escherichia coli

➤ caractères généraux

C'est des bacilles à Gram négatif, mobiles, à ciliature péritriche, aéro-anaérobie facultatifs, qui poussent sur des milieux ordinaires (LAVIGNE, 2014). Cette bactérie est une commensale du tube digestif de l'homme et des animaux à sang chaud, mais certaines souches sont cependant pathogènes à cause de leur acquisition à des facteurs de virulence tel rouges et aux cellules épithéliales (NAUCIEL et VILDE, 2005).

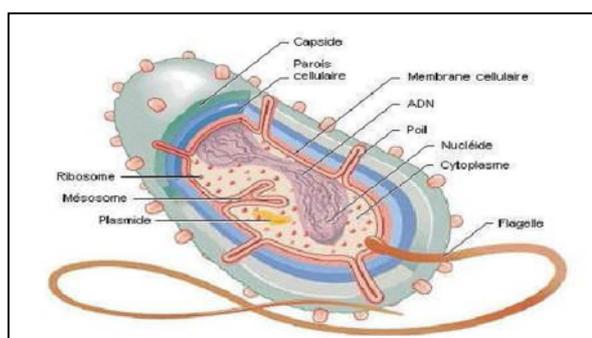


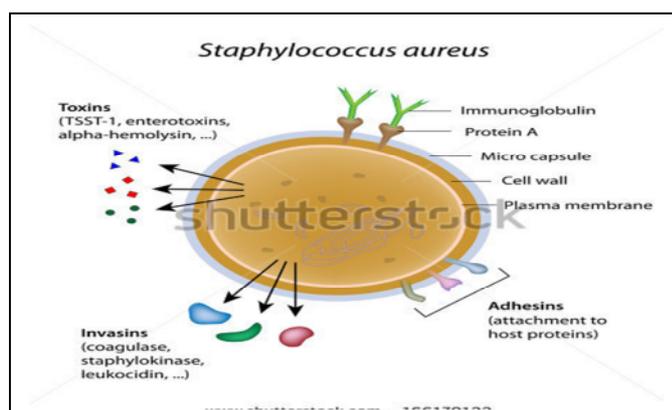
Schéma montrant l'anatomie de *E. coli*.

(www.gastroscan.ru)

Staphylococcus aureus

➤ caractères généraux

Les *S. aureus* sont des cocci à Gram positif, isolés ou groupés en amas, immobiles, non sporulés, parfois encapsulés. Les staphylocoques sont des bactéries commensales de la peau et des muqueuses de l'homme et de l'animal. L'homme est le principal réservoir naturel de *Staphylococcus*, il présente un portage sain, principalement au niveau des cavités nasales (WYLIE et NOWICKI, 2005).



Schématisation de l'anatomie de *Staphylococcus aureus*.

(<https://www.alilamedicalimage.com>)

Pseudomonas aeruginosa

➤ **Caractères généraux**

P. aeruginosa se présente comme un fin bacille à Gram négatif, asporulé et acapsulé, mobile grâce à une ciliature polaire, il possède souvent des granulations plus fortement colorées. elle possède deux pigments caractéristiques : la pyoverdine et la pyocyanine et est caractérisée par sa résistance aux antiseptiques et aux antibiotiques (HAFIANE, 2008).

Ce germe est doté d'un véritable arsenal de facteurs de virulence qui sont, soit directement associés à sa cellule, soit excrétés dans le milieu extracellulaire (RICHARD, 2005).



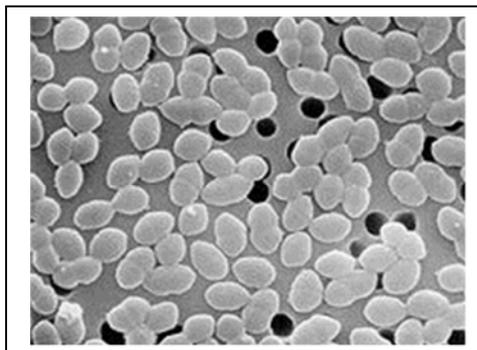
Image de *Pseudomonas aeruginosa*

(www.gastroscan.ru)

Enterococcus faecalis

➤ **Caractères généraux**

E. faecalis sont des cocci à Gram positif, à métabolisme aéro-anaérobie facultatif, caractérisés par un certain polymorphisme : coques souvent de dimensions inégales, se présentant en diplococoques ou en courtes chaînettes. Ils sont immobiles et sans capsule (BOURET, 2010) et produisent des protéines de surfaces lui permettant d'adhérer à l'urothélium et à l'endocarde (PRADEL, 2016). Certaines souches sont antibio-résistantes et causent plus de 10 % des infections nosocomiales en pédiatrie (LANGLEY *et al.*, 2001). Cette espèce constitue la flore normale de l'intestin de l'homme et des animaux et colonisent aussi la bouche, les voies respiratoires supérieures, le vagin et la région périnéale.



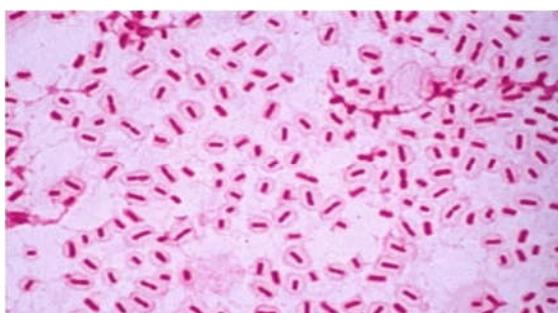
Apparence de *Enterococcus faecalis* sous microscope électronique.

(<https://ca.wikipedia.org>)

Klebsiella pneumoniae

➤ **Caractères généraux**

K. pneumoniae se présentent sous forme de bacilles à Gram négatif de 0.3 à 1.0 μ m de diamètre sur 0.6 à 6 μ m de longueur, de manière isolée ou groupés par deux ou en courtes chaînes (AYAN *et al.*, 2003). Ce sont des bactéries immobiles, non sporulées. Cette espèce est une est ubiquiste, isolée des eaux de surfaces, des effluents industriels, du sol, de végétaux divers et des aliments (DONG *et al.*, 2003). Elle est également retrouvée dans la flore fécale d'environ 30% des animaux et de l'homme, elle existe à l'état commensal sur la peau et les muqueuses, notamment respiratoires (BOURWOLF *et al.*, 2002).



Aspect des cellules de *Klebsiella pneumoniae* sous microscopie photonique a grossissement x100

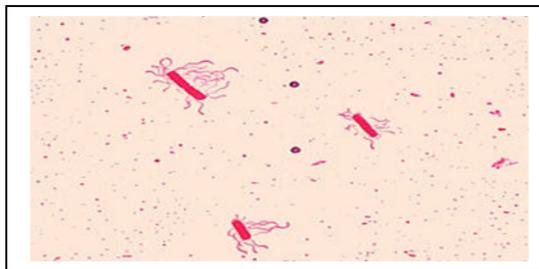
(<https://www.pinterest.com>)

Bacillus cereus

➤ **caractères généraux**

La morphologie du germe correspond à un grand bacille de 1 μ m de large pour 2 à 4 μ m de long, à Gram positif, sporulé, mobile grâce à une ciliature péritriche, avec une capsule formée de polypeptides d'acides glutamique et dépourvu de flagelles. *B. cereus* est de type

respiratoire aéro-anaérobie, et synthétisant deux types de toxines : une thermostable et une autre thermolabile. Son habitat naturel est le sol mais aussi, il constitue un commensale du tube digestif des insectes et des animaux à sang chaud (FRITZ *et al.*, 2008).

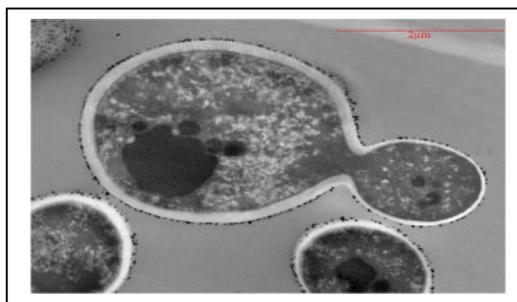


Apparence de *B.cereus* sous microscope photonique à grossissement x100
(<https://fr.wikipedia.org>)

Candida albicans

➤ Caractères généraux

C. albicans est une levure unicellulaire ovale à Gram positif, bourgeonnante, avec un diamètre d'environ 4-6 μm . Ce microorganisme se cultive sur des milieux habituels, il forme des colonies rondes, blanchâtres avec une surface légèrement rugueuse. *Candida* est présent comme commensale sur les muqueuses de l'homme et de l'animal, c'est pour cette raison que les infections à *Candida* sont considérées comme des infections endogènes.



Candida albicans sous microscopie électronique.

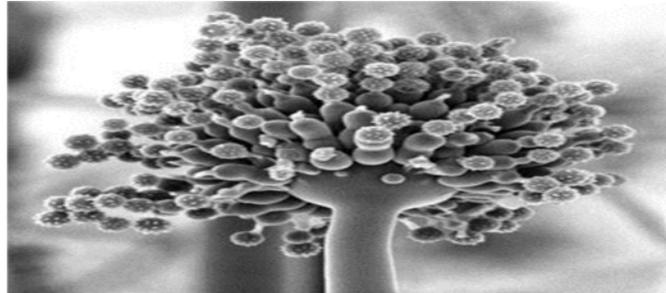
(www.biotrans.uni.wroc.pl)

Aspergillus niger

➤ Caractères généraux

A. niger est une moisissure saprophyte, tirant sa nourriture de substances organiques en décomposition, à métabolisme aérobie, formé de filaments hyalins, cloisonnés et haploïdes. Les colonies apparaissent d'abord blanches, puis jaunes, et enfin granuleuses noires (QUARTISOUS, 2011).

Aspergillus niger est une espèce cosmopolite, qui a été signalée dans le monde entier, préférant habituellement les sols secs et chauds. Elle peut contaminer la viande et les œufs, ou les fruits séchés au soleil. Elle peut aussi endommager les cuirs en surface et en épaisseur.



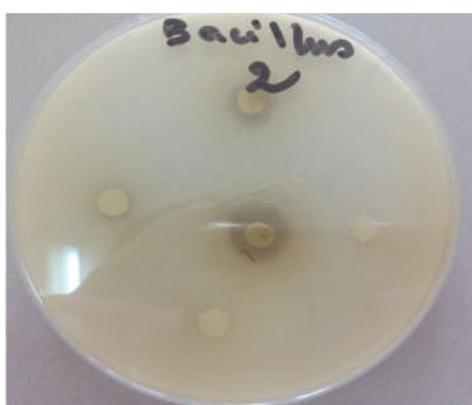
Aspect de *A. niger* sous microscopie électronique.
(<https://microbwiki.kenyon.edu>)

Annexe 3



Exemples des repiquages des souches testées (*Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa*)

Annexe 4

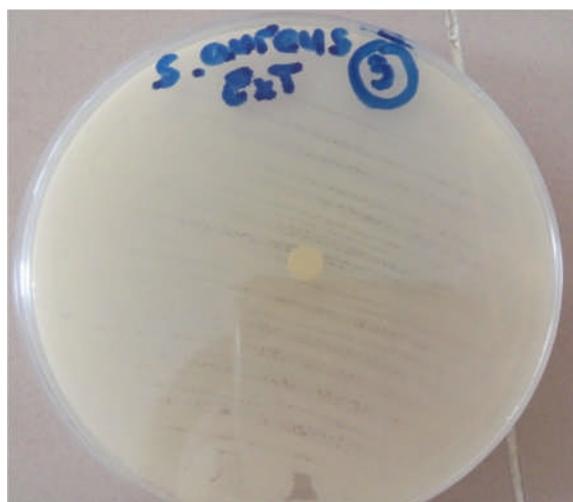
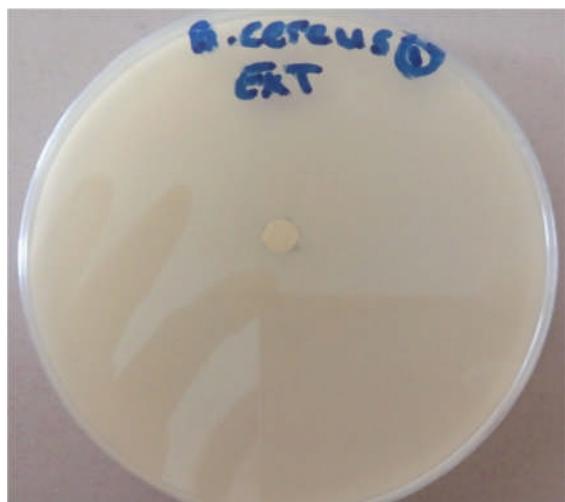


Résultats des CMI de quelques souches étudiées.



Test montrant la résistance de la levure *Candida albicans* à un antifongique et à l'extrait.

Annexe 5



Effet de la phase liquide issue de la première extraction sur les souches testées.

Annexe 6

Tableau : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition des antibiotiques utilisés.

antibiotiques	sigle	sensibilité	intermédiaire	résistance
Amoxicilline+ aide clavulanique	AMC	>20	15-20	15
Céfalotine				
Céfazoline	CZ	>18	12-18	<12
Céfotaxime	CTX	>23	15-23	<15
Imipinème	IMI	>16	14-16	<14
Amikacine	AN	>17	15-17	<15
Gentamicine	Gen	>16	14-16	<14
Ac.nalidixique	NA	>20	15-20	<15
Ciprofloxacine	CIP	>21	16-21	<16
Colistine	CS	>15	15	<15
Nitrofurane	NIT	>17	14-17	<14
Fosfomycine	FF	>12	13-15	<16
cotrimoxazole	COT	>16	11-16	<11
Cefoxitine	FOX	G- : > 18 G+ : > 22	15-17 15-17	<14 <14
Ampicilline	AMP	>19	14-19	<14
Aztreonam	ATm	>50	16-50	<16
Tobramycine	Tob	>16	16	<16
Piperacilline	PRL	>19	19	<19
Oflaxacin	OF	>22	16-22	<16
Clindamycine	DA	>18	13-18	<13
Tetracycline	TE	>19	17-19	<17
Oxacilline	OX	>13	11-13	<11
Amikacine	AK	>17	15-17	<15
kanamycine	K	>18	13-18	<13
Acide fusidique	FC	>22	15-22	<15
Vancomycine	VA	>19	14-19	<14

G+ : Gram positif

G- : Gram négatif

Etude préliminaire d'une plante médicinale saharienne : phytochimie, activité antimicrobienne et inhibitrice de biofilm.

Résumé : La résistance des bactéries aux antibiotiques est devenue une véritable préoccupation. Face à cela, la recherche de composés antimicrobiens est plus que jamais d'actualité. Les plantes constituent une source potentielle de ces composés. La présente étude décrit l'étude de la composition chimique de *Pulicaria crispa* (Asteraceae) plante médicinale du Hoggar, son activité antimicrobienne à l'encontre de quelques souches cliniques et des souches de références et anti formation des biofilms, elle décrit aussi l'effet de son huile essentielle contre deux bactéries *B. cereus* et *S. aureus*. Les composants de la plante sont analysés par un screening phytochimique qui a révélé une forte concentration de mucillages, saponosides et de flavonoïdes.

Deux extraits sont obtenus par macération méthanolique. La plus forte concentration en polyphénols (15,12 mg/mL) et la meilleure activité antibactérienne (10 à 18 mm) sont attribuées à la phase solide de la première extraction. L'activité de l'HE s'est avérée moins intéressante comparant à cette dernière. Le 2^{ème} extrait est utilisé pour tester l'effet antifongique, les résultats ont montré une réduction de l'évolution de *A. niger* contrairement à *C. albicans* qui s'est montré résistante. Le même extrait a été encore utilisé pour le test de la CMIB sur microplaque, une diminution remarquable de l'épaisseur du biofilm en fonction des concentrations de l'extrait a été notée. Ce travail démontre que l'amélioration des activités biologiques des plantes par des études phytochimiques et biologiques contrôlés peut être un élément crucial à la contribution de leur valorisation.

Mots clés : *Pulicaria crispa*, composition chimique, polyphénols, huile essentielle, activité antimicrobienne, CMIB.

Preliminary study of a Saharan medicinal plant: phytochemistry, antimicrobial activity and biofilm inhibition.

Summary: The resistance of bacteria to antibiotics has become a real concern. Faced with this, the search for antimicrobial compounds is more relevant than ever. Plants are a potential source of these compounds. The present study describes the study of the chemical composition of *Pulicaria crispa* (Asteraceae) medicinal plant of Hoggar, its antimicrobial activity against some clinical strains and reference strains and anti formation of biofilms. also describes the effect of its essential oil against two bacteria *B. cereus* and *S. aureus*. The components of the plant are analyzed by a phytochemical screening that revealed a high concentration of mucillages, saponosides and flavonoids.

Two extracts are obtained by methanol maceration. The highest concentration of polyphenols (15.12 mg / mL) and the best antibacterial activity (10-18 mm) are attributed to the solid phase of the first extraction. The activity of the EO was less interesting compared to the latter. The 2nd extract is used to test the antifungal effect, the results showed a reduction in the evolution of *A. niger* unlike *C. albicans* which was resistant. The same extract was again used for the microplate MCBI test, a remarkable decrease in biofilm thickness as a function of the concentrations of the extract was noted. This work demonstrates that the improvement of plant biological activities through controlled phytochemical and biological studies can be a crucial element in the contribution of their valuation.

Key words: *Pulicaria crispa*, chemical composition, polyphenols, essential oil, antimicrobial activity, MCBI.

