

**UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA**

**Faculte des sciences Agro-vétérinaires  
Département des sciences agronomiques**

**MEMOIRE DE MAGISTER**

Spécialité : Amélioration des productions végétales

COMPOSITION CHIMIQUE ET ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DES  
HUILES ESSENTIELLES D'*ARTEMISIA HERBA ALBA ASSO* ET  
*ARTEMISIA CAMPESTRIS L* DE LA REGION ARIDE DE DJELFA

Par

**Souhila TOUIL**

Devant le jury composé de

SA. SNOUSSI	Professeur, USD Blida	Président
FZ. BENREBIHA	Professeur, USD Blida	Promottrice
F. BOUCHENAK	Maître assistante A, USD Blida	Co-promotrice
M. BENCHAAABANE	Maître de conférences A, USD Blida	Examineur
T. HADJ-SADOK	Maître de conférences B, USD Blida	Examineur

Blida, 14 Novembre 2012

## RESUME

La présente étude a été menée pour caractériser la composition chimique des huiles essentielles d'*Artemisia campestris* L et *Artemisia herba Alba* Asso provenant de la région de Djelfa et évaluer leur activité anti- microbienne vis-à-vis de trois souches bactériennes (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*) et trois espèces fongiques (*Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium expansum*).

Les huiles essentielles extraites par hydrodistillation à partir des parties aériennes de l'armoise champêtre et de l'armoise blanche ont présenté un rendement de 0,3 et 0,7% respectivement.

Les H.Es ont été analysées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM) pour la détermination de leur composition chimique et l'identification de leur chémotype. Les résultats de l'analyse ont montré que l'huile d'*A.herba alba* est un chémotype davanone qui est constituée principalement de davanone (62,2%) alors que l'H.E de l'*Artemisia campestris* est caractérisée par la présence de  $\beta$ -pinène (20,75 %) et du limonène (10,46%) et du  $\gamma$ -terpinene (10,18 %) comme principaux constituants chimiques.

Les huiles essentielles sont active in vitro contre les bactéries *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et *Micrococcus luteus*. En revanche toutes les souches fongiques testées se sont révélées insensibles aux huiles essentielles étudiées.

### Mots-clés :

Huile essentielle, *Artemisia campestris* L, *Artemisia herba alba* Asso, CG-MS, composition chimique, activité antibactérienne, activité antifongique.

## ABSTRAT

The present study was conducted to characterize the chemical composition of essential oils of *Artemisia campestris* and *Artemisia herba Alba* L Asso from the Djelfa region and assess their antimicrobial activity vis-à-vis the three bacterial strains (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*) and three fungal species (*Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium expansum*).

Essential oils extracted by hydrodistillation from the aerial parts of the country and sagebrush sagebrush showed a yield of 0.3 and 0.7% respectively.

The essential oils were analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC / MS) to determine their chemical composition and their identification chemotype. The results of the analysis showed that oil A. Herba alba chemotype is davanon which consists mainly of davanon (62.2%) while HE *Artemisia campestris* is characterized by the presence of  $\beta$ -pinene (20.75%) and limonene (10.46%) and  $\gamma$ -terpinene (10.18%) as major chemical constituents.

Essential oils are active in vitro against *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Micrococcus luteus*. However all fungal strains tested proved impervious to oils studied.

### **Keywords:**

Essential oil, *Artemisia campestris* L, *Artemisia herba alba* Asso, GC-MS, chemical composition, antibacterial, antifungal activity.

## ملخص

يهدف هذا العمل إلى دراسة التركيب الكيميائي والنشاط المضاد للبكتيريا والفطريات للزيوت الأساسية المستخرجة من الشيح الأبيض *Artemisia herba alba* و القيصوم *Artemisia campestris* لمنطقة الجلفة ضد ستة كائنات حية دقيقة. (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium expansum*).

الزيوت الأساسية المستخرجة من الأجزاء الهوائية للقيصوم و الشيح الأبيض بواسطة التقطير أظهرت عائدا قدره 0.3 إلى 0.7 % على التوالي.

وقد بينت نتائج التحليل بواسطة GC / MS أن زيت الشيح الأبيض هو « chemotype davanone » الذي يتكون أساسا من davanone (2. 62 %) فيما يخص زيت القيصوم فيتميز بوجود  $\beta$ -pinène (20.75 %) ، و limonène (10.46 %) و  $\gamma$ -terpinene (10.18 %) لمكونات أساسية.

كما أثبتت الدراسة ان هذه الزيوت العطرية فعالة ضد جميع البكتيريا المدروسة *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* بعكس السلالات الفطرية التي وجد أن جميعها مقاومة لهذه الزيوت.

**الكلمات المفاتيح :** الزيوت الأساسية، الشيح الأبيض، القيصوم، GC - MS ، التركيب الكيميائي ، النشاط المضادة للبكتيريا ، والنشاط المضادة للفطريات.

## **REMERCIEMENTS**

Que tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué, par leurs conseils, leurs encouragements ou leur amitié à l'aboutissement de ce travail, trouvent ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Mes vifs remerciements accompagnés de toute ma gratitude vont tout d'abord à ma Promotrice Madame BENREBIHA, pour m'avoir proposé ce sujet et dirigé mon travail ainsi que pour la marque de confiance qu'ils m'ont manifestée.

Mes remerciements vont aussi à ma co-directrice Madame BOUCHENAK, qui a su me laisser la liberté nécessaire à l'accomplissement de mes travaux, tout en y gardant un œil critique et avisé.

Je remercie respectueusement Monsieur SNOUSSI S.A., Professeur à l'université de Blida, qui m'a fait l'honneur de présider le jury de cette Thèse malgré ses nombreuses charges. Je tiens à lui exprimer ma gratitude et mon grand respect.

Je remercie vivement Monsieur BENCHAAABANE M., Maître de conférences à université de Blida et Monsieur HADJ-SADDOUK T., Maître de conférences à université de Blida qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail et pour le temps qu'ils ont consacré pour la lecture de ce document et d'en être les rapporteurs malgré leurs nombreux engagements.

## **DEDICACES**

« Louange à Dieu, le seul et unique »

A la mémoire de mon père

A ma mère

A toute ma famille,

A tous ceux que j'aime

A tous ceux qui ont participé de loin ou de près à la réalisation de ce travail.

Avec l'expression de tous mes sentiments de respect,

Je dédie ce modeste travail.

## TABLE DES MATIRES

RÉSUMÉ .....	
REMERCIEMENTS .....	
TABLE DES MATIÈRES .....	
LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX .....	
INTRODUCTION .....	10
1. PRESENTATION DES PLANTES ETUDIEES .....	12
Famille Asteraceae .....	12
Le genre Artemisia.....	12
1. <i>Artémisia herba alba</i> Asso .....	13
2. <i>Artemisia campestris</i> L .....	
2. LES HUILES ESSENTIELLES .....	22
2.1 Historique .....	22
2.2 Définition .....	22
2.3 Localisation et lieu de synthèse .....	23
2.4 Propriétés physico-chimique .....	24
2.5 Rôle physiologique .....	24
2.6 Composition chimique .....	24
2.7 Facteurs influençant la composition chimique .....	30
2.8 Activités biologiques .....	31
2.9 Méthodes d'extraction .....	38
2.10 Méthodes de caractérisation des huiles essentielles .....	40
2.11 Les huiles essentielles d' <i>A. herba alba</i> Asso.....	42
2.12 Les huiles essentielles d' <i>A. campestris</i> L.....	43
3. LES MICROORGANISMES ETUDIES.....	44
3.1 Les bactéries cibles.....	44
3.1.1 <i>Escherichia coli</i> .....	44
3.1.2 <i>Bacillus subtilis</i> .....	45
3.1.3 <i>Micrococcus luteus</i> .....	46
3.2 Les champignons cibles.....	47

3.2.1	Le genre <i>Aspergillus</i> .....	47
3.2.2	Le genre <i>Penicillium</i> .....	50
4.	MATERIEL ET METHODES.....	52
4.1	Expérimentation.....	52
4.2	Matériel végétal.....	52
4.3	Microorganismes utilisés.....	54
4.4	Les milieux de culture.....	54
4.5	Procédé d'extraction .....	54
4.6	Calcul du rendement .....	55
4.7	Analyse de la composition chimique des H.Es par CG/SM .....	56
4.8	Tests microbiologiques .....	56
4.8.1	Préparation de pré-culture.....	56
4.8.2	Essai antifongique .....	57
4.8.3	Essai antibactérien .....	57
5.	RESULTATS ET DISCUSSION .....	62
5.1	Rendement des HE .....	62
5.2	Analyse de la composition chimique .....	63
5.2.1	Analyse de la composition chimique d' <i>Artemisia campestris</i> L. ....	64
5.2.2	Analyse de la composition chimique d' <i>Artemisia herba alba</i> Asso .....	66
5.3	Activité antibactérienne de l'HE d' <i>A. herba alba</i> et d' <i>A.campestris</i> .....	72
5.3.1	Activité antibactérienne de l'H.E d' <i>A. Herba alba</i> ... ..	72
5.3.2	Activité antibactérienne avec l'H.E d' <i>A.campestris</i> .....	75
5.4	Activité antifongique de l'HE d' <i>A. herba alba</i> et d' <i>A.campestris</i> .....	77
5.5	Concentrations minimales inhibitrices de l'HE d' <i>A. herba alba</i> et d' <i>A.campestris</i> .....	81
5.6	Nature de l'activité antibiotique de l'HE d' <i>A. herba alba</i> et d' <i>A.campestris</i> .....	84
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	87
	REFERENCES.....	89
	APPENDICES.....	
	A. LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS.....	
	B. COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE UTILISES .....	



## LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

<b>Figure 1.1</b>	Illustration des différents aspects morphologiques d' <i>Artemisia herba alba</i>	14
<b>Figure 1.2</b>	Aire de répartition d' <i>Artemisia herba alba</i> Asso en Algérie	16
<b>Figure 2.3</b>	Certaines molécules représentatives des monoterpènes acycliques et monocycliques	27
<b>Figure 2.4</b>	Principaux sesquiterpènes	28
<b>Figure 2.5</b>	Illustration de la méthode d'aromatogramme	35
<b>Figure 2.6</b>	Illustration de la méthode de microatmosphère	36
<b>Figure 2.7</b>	Schéma représentant la technique de contact direct	36
<b>Figure 4.8</b>	Vue d'ensemble d'un pied d' <i>Artemisia campestris</i> L	53
<b>Figure 4.9</b>	Vue d'ensemble d'un pied d' <i>Artemisia herba alba</i> Asso	53
<b>Figure 5.10</b>	Profil chromatographique de L'H.E d'A. <i>campestris</i> analysée par CG/SM	64
<b>Figure 5.11</b>	Profil chromatographique de L'H.E d'A. <i>herba alba</i> analysée par CG/SM	67
<b>Figure 5.12</b>	Effet de l'H.E d'A. <i>herba alba</i> sur: <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> et <i>M. luteus</i>	72
<b>Figure 5.13</b>	Effet de l'H.E d'A. <i>campestris</i> sur: <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> et <i>M. luteus</i>	75
<b>Figure 5.14</b>	Effet de l'H.E d'A. <i>herba alba</i> et H.E <i>A.campestris</i> sur <i>Aspergillus carbonarius</i>	78
<b>Figure 5.15</b>	Effet de l'H.E d'A. <i>herba alba</i> et H.E <i>A.campestris</i> sur <i>Aspergillus flavus</i>	78
<b>Figure 5.16</b>	Effet de l'H.E d'A. <i>herba alba</i> et H.E <i>A.campestris</i> sur <i>Penicillium expansum</i>	78
<b>Figure 5.17</b>	Photographie montrant la nature de l'activité antibiotique des H.E de l'A. <i>herba alba</i> et de l'A. <i>campestris</i> sur <i>Micrococcus luteus</i>	85
<b>Figure 5.18</b>	Photographie montrant la nature de l'activité antibiotique des H.E de l'A. <i>herba alba</i> et de l'A. <i>campestris</i> sur <i>Escherichia coli</i>	85
<b>Figure 5.19</b>	Photographie montrant la nature de l'activité antibiotique des H.E de l'A. <i>herba alba</i> et de l'A. <i>campestris</i> sur <i>Bacillus subtilis</i>	85
<b>Tableau 2.1</b>	Activités biologiques de certains composés terpéniques	29
<b>Tableau 4.2</b>	Liste des souches microbiennes testées	54
<b>Tableau 4.3</b>	Valeurs des dilutions utilisées pour déterminer les CMI	60
<b>Tableau 5.4</b>	Principaux composés chimiques (%) de L'H.E d'A. <i>campestris</i> analysée par la CG/SM	65

<b>Tableau 5.5</b>	Principaux composés chimiques (%) de L'H.E d' <i>A. herba alba</i> analysée par la CG/SM	68
<b>Tableau 5.6</b>	Diamètres des zones (mm) d'inhibitions (moyenne $\pm$ écart type) des H.Es d' <i>Artemisia</i>	71
<b>Tableau 5.7</b>	Halos d'inhibition en (mm) (moyenne $\pm$ écart type) provoqués par l'H.E d' <i>A.herba alba</i> Asso	73
<b>Tableau 5.8</b>	Halos d'inhibition en (mm) (moyenne $\pm$ écart type) provoqués par l'H.E d' <i>A.campestris</i> L	75
<b>Tableau 5.9</b>	Effet de l'huile essentielle d' <i>A.herba alba</i> et d' <i>A.campestris</i> sur le diamètre (mm) des colonies mycéliennes et sur le taux d'inhibition	79
<b>Tableau 5.10</b>	Résultats de l'activité antimicrobienne CMI des HE d' <i>Artemisia herba-alba</i> et d' <i>Artemisia campestris</i>	81
<b>Tableau 5.11</b>	Les valeurs des CMIs des H.Es testées en ( $\mu$ l/ml)	83

## INTRODUCTION

Les produits chimiques synthétiques sont connus pour leurs propriétés cancérigènes. L'application excessive des bactéricides et des fongicides de synthèse a été averti suite à leur toxicité et de pollution résiduelle qui en découlent. De même, beaucoup de microorganismes pathogènes peuvent développer des résistances à ces produits. Pour cela, la lutte contre les microorganismes est orientée vers l'utilisation des méthodes biologiques. Cependant, énormément de recherches ont été effectuées sur l'étude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles notamment contre différentes espèces bactériennes et fongiques [1][2].

Actuellement, les huiles essentielles représentent un outil très intéressant pour augmenter la durée de conservation des produits alimentaires. Ces substances naturelles riches en composés antimicrobiens et antioxydants sont considérées comme alternative importante pour résoudre le problème d'altération post-récolte liée aux bactéries et aux moisissures et d'éviter la perte en qualité et en quantité de ces produits pendant l'entreposage [3].

Le genre *Artemisia* est parmi les plus importantes et les plus largement distribués genres de la famille Asteraceae, composé de 522 petites herbes et d'arbustes [4]

Les industries pharmaceutiques ont exploité de nombreux composés extraits de différentes armoises, comme les thujones (*A. absinthium*), l'artémisinine (*A. annua*) ou la verlotrine (*A. verlotiorum*) [5].

L'Algérie, par sa situation géographique, offre une végétation riche et diverse. Un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales y pousse spontanément. L'intérêt porté à ces plantes n'a pas cessé de croître au cours de ces dernières années. Leurs propriétés, dues notamment à la fraction huile essentielle, peuvent être mises à profit pour lutter contre les microorganismes pathogènes. A cet effet, et dans le cadre de la valorisation de la flore algérienne, on s'est intéressé aux deux espèces du Genre d'*Artemisia* : *Artemisia campestris* L ("T'gouft"), et *Artemisia herba Alba* Asso ("Chih») qui sont largement utilisé comme plantes médicinales par les populations locales dans les hauts plateaux d'Algérie à plusieurs fins.

Ainsi, de nombreux composés phytochimiques y compris les huiles essentielles commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives. Elles font l'objet d'étude pour leur éventuelle utilisation comme antioxydants, antimicrobiens, anti-inflammatoire et anticancéreux.

C'est dans cette optique que se situe notre étude dont les objectifs principaux se résument dans les volets suivants :

- Mettre à profit les huiles essentielles d'*A.herba alba* Asso et d'*A.campestris* L et leurs valorisation ;
- Caractérisation de la composition chimique quantitativement et qualitativement des huiles essentielles extraites par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM) ;
- Des tests de sensibilité pour évaluer « in vitro » l'activité antibactérienne et antifongique en déterminant la concentration minimale inhibitrice (CMI) des huiles extraites sur un ensemble de bactéries et moisissures pathogènes qui sont à l'origine d'intoxication alimentaire.

## CHAPITRE 1

### PRESENTATION DES PLANTES ETUDIEES

(*Artemisia herba alba* Asso, *Artemisia campestris* L)

#### Famille Asteraceae

La famille des Astéracées représente l'un des taxons les plus importants du règne végétal. Elle est principalement représentée par des espèces vivaces. Les feuilles sont le plus souvent alternes, mais aussi opposées ou radiales, bractées, simples ou parfois composées [6]. Les fleurs ont la caractéristique commune d'être réunies en capitules, c'est-à-dire serrées les unes aux autres [6][7]. La famille des Astéracées (Compositae) compte approximativement 900 genres avec plus de 13 000 espèces [8].

#### Le genre Artemisia

Le genre *Artemisia* L. est parmi les plus importantes et les plus largement distribués genres de la famille Asteraceae, composé de 522 petites herbes et d'arbustes [4]. Elles sont très répandues dans les terres arides, y compris notamment l'ouest des Etats-Unis, les steppes asiatiques et les parties arides du Nord-Ouest de la région himalayenne [9].

Le genre peut être divisé en sections *Artemisia* et *Dracunculus* [10]. Ces herbes ont été utilisées dans le monde en médecine traditionnelle depuis l'Antiquité. Ils ont été utilisés comme toniques, antipaludiques, anthelminthiques et antidiabétiques, et dans le traitement des plaies, de la bronchite, ulcères, et la tuberculose. Il ya également plusieurs rapports concernant les antipaludéens, anti-oxydant, cytotoxique, antipyrétique, analgésique, antimicrobien, et des activités antifongiques des différentes espèces d'*Artemisia* [4].

Le genre d'*Artemisia* est connu pour contenir de nombreux composés bioactifs; par exemple l'artémisinine qui a non seulement une activité antipaludique mais il a aussi une action profonde contre la cytotoxicité des cellules tumorales [11].

Les industries pharmaceutiques ont aussi exploité de nombreux composés extraits de différentes armoises, comme les thujones (*A. absinthium*), l'artémisinine (*A. annua*) ou la verlotrine (*A. verlotiorum*). Depuis peu, *A. capillaris* (aussi appelée

*A. scoparia*) suscite l'engouement des chercheurs à cause d'un métabolite secondaire particulièrement actif, le capillène [5].

### 1. *Artemisia herba alba* Asso

*Artemisia herba alba* est une plante herbacée commune en terrains sec en Afrique du nord, en Arabie, en Syrie et en Iran [9].

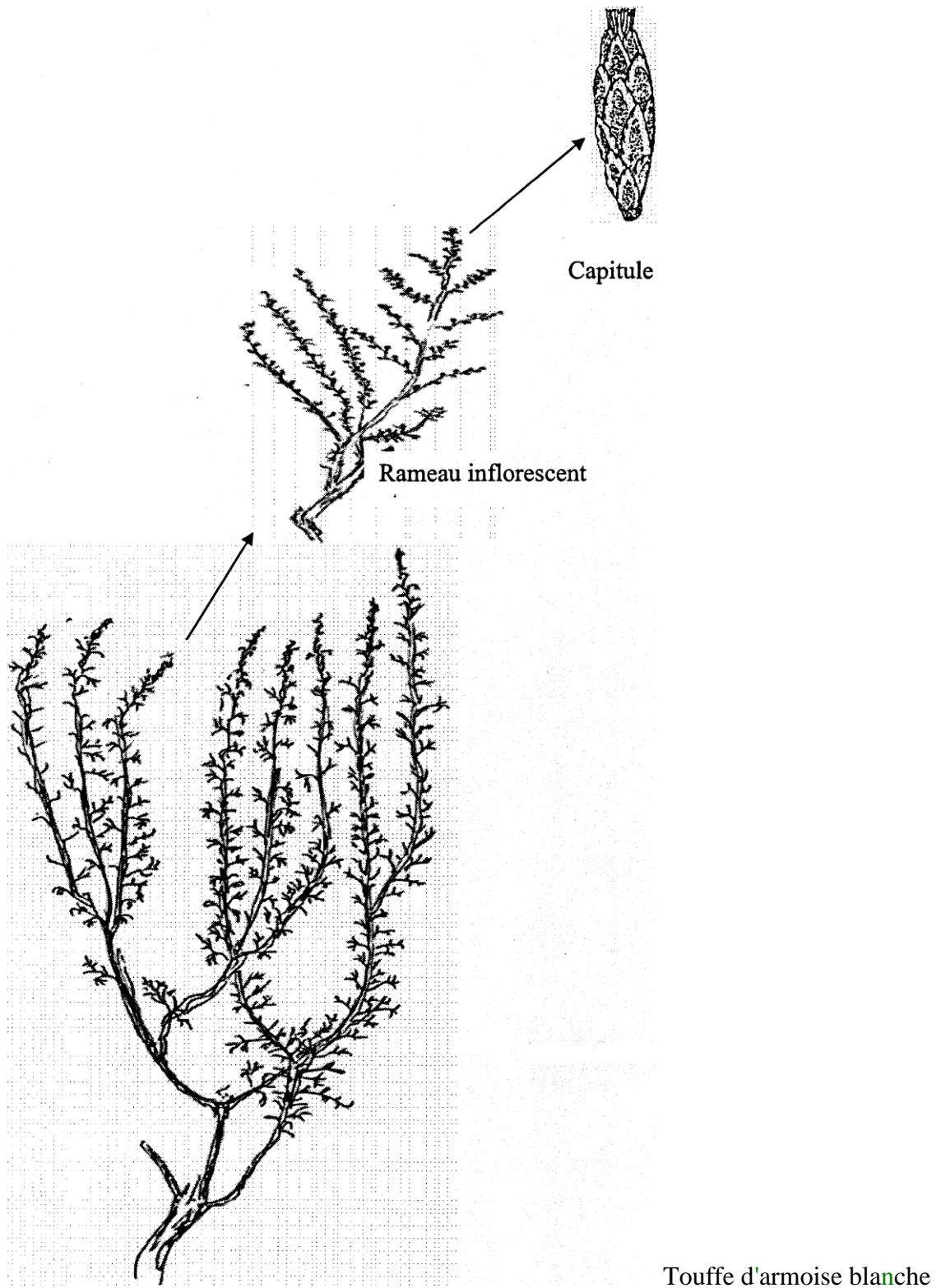
*A. herba alba* est l'une des 11 espèces d'Artémisia spontanées enregistrées en Algérie [12].

#### 1.2. Caractéristiques morphologiques de la plante

*Artemisia herba alba* est une chaméphyte ligneuse qui se développe en touffes bien individualisées très ramifiée dès la base (figure 1.1). La morphologie générale de la touffe d'armoise dépend essentiellement des conditions du milieu et surtout de l'intensité de son exploitation par le pâturage. Lorsqu'elle est peu pâturée, elle se présente en touffe ronde bien développée d'une hauteur d'environ 25 à 30 cm et d'un diamètre moyen de 30 à 40 cm [13].

Plante vivace en petit buisson à racines obliques nombreuses et rhizosphère peu profonde, tiges ligneuses, ramifiées pouvant atteindre 70 cm de haut, beiges, très feuillés a rameaux très tomenteux. Feuilles profondément bipennatiséquées, gris-argentées tomenteuses, les inférieures pétiolées, les caulinaires de plus en plus courtes et passant aux bractées sessiles dans l'inflorescence [14].

*A. herba alba* est une chaméphyte, souvent devenu hemicryptophyte par le pâturage, elle fleuri au printemps et souvent aussi à l'automne après les premières pluies [14].



**Figure 1.1** : Illustration des différents aspects morphologiques *d'Artemisia herba alba*  
Asso (Dessin, Lokriz L)

### 1.3. Taxonomie

*Artemisia herba alba* Asso a été décrite pour la première fois par le botaniste espagnol « Asso » en 1779 [13].

La systématique de l'*A. herba alba* se présente comme suite [15]:

**Embranchement :** Spermatophyte

**Sous embranchement :** Angiospermes

**Classe :** dicotylédones

**Sous classe :** Gamopétales

**Ordre :** Astérales

**Famille :** Composées

**Sous famille :** Radiées

**Genre :** *Artemisia*

**Espèce :** *Artemisia herba alba* Asso

**Noms vulgaire :** Armoise blanche

**Noms arabe :** Chih, ifsi, zeuzère.

Plusieurs sous espèces ou variétés ont été citées, *Saharae* Pomel [15] , *incana* Bois ( blanche et velue ) et *glabrescens* Bois [13].

HAOUARI et FERCHICHI [16] ont mis en évidence l'existence de deux variétés sur la base de comptages chromosomiques, la variété communis (n = 9) et la variété desserti (n = 18)

### 1.4. Aire de répartition

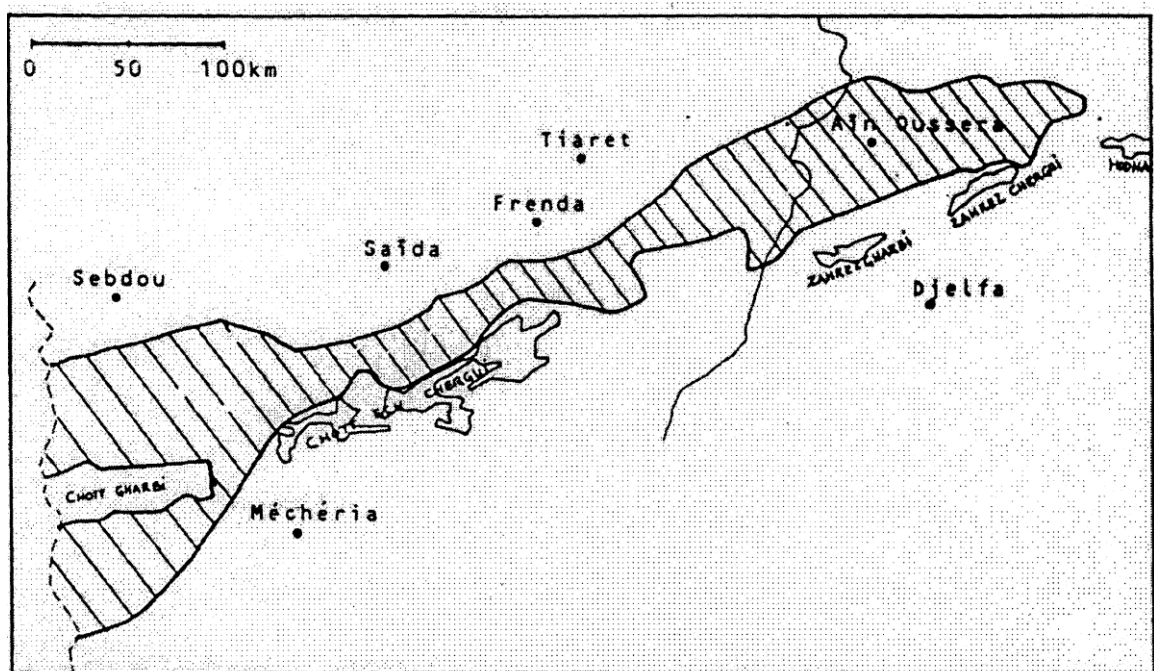
L'armoise blanche est considérée comme une espèce irano touranienne [13]. L'*A. herba alba* est un arbuste qui pousse dans les zones arides du bassin méditerranéen, s'étendant dans l'Himalaya du nord – ouest. Cette plante est abondante dans la péninsule ibérique et atteint sa plus haute population dans le centre de l'Espagne [17].

Selon l'Organisation des Nations unies pour l'éducation, la science et la culture « UNESCO » [9], l'*A. herba alba* est une plante très répandue en Afrique du nord, au Maroc, et dans les déserts du Sahara et de l'Égypte.



D'après KAABECHE [18], sa répartition s'étend sur trois régions floristique, irano-touranienne, (Iran, Turkménistan, Ouzbékistan), méditerranéenne et saharo – arabique.

En Algérie, la superficie occupée par cette espèce est variable selon les auteurs. D'après AYAD et al [19], l'armoïse blanche présente une vaste répartition géographique couvrant environs 4 millions d'hectares. Quant à NEDJRAOUI [20], les steppes à armoïse blanche couvrant 3 millions d'hectares (figure 1.2).



**Figure 1.2 :** Aire de répartition d'*Artemisia herba alba* Asso en Algérie AIDOU [13]

### 1.5. Ecologie

*A. herba alba* est très répandue dans les hauts plateaux où elle forme de vastes nappes dans les zones argileuses et humides des nappes alfatières [19].

L'armoïse blanche est une plante peuplant les steppes argileuses, pâturages rocaillieux et terreux des plateaux et des basses montagnes des régions sèches [20]. Elle appartient à l'intervalle bioclimatique allant de l'étage semi-aride supérieur à l'étage saharien inférieur. Il semble toutefois que l'espèce trouve son optimum en tant que espèce dominante dans l'étage bioclimatique aride [13] et aride frais parfois semi-aride frais avec une pluviosité moyenne de 100 à 300 mm [21].

Au plan édaphique c'est une plante typique des sols limono-sableux des glaces à croutes calcaires [22]. En Algérie, la texture la plus répandue de l'armoise blanche est limono-sableuse [23]. D'après AYAD [19], les groupements à armoise blanche colonisent les dépressions non salées et les glacis à sols généralement limoneux, peu perméables et à ruissellement important.

#### 1.6. Phytochimie de l'armoise blanche

Plusieurs métabolites secondaires ont été isolés de l'*Artemisia herba alba* peut-être les plus importants sont les sesquiterpènes lactones. D'autres études ont été portées sur les flavonoïdes et l'huile essentielle.

Plusieurs types de structures de lactones sesquiterpéniques ont été trouvés dans les parties aériennes de l'*A. herba alba*. Eudesmanolides suivie par le germacranolides semblent être les types les plus abondants des lactones trouve dans cette espèce [24].

Les composés phénoliques présents dans cette plante pourraient être à l'origine de certaines de ses activités biologiques ce qui la rend apte pour son utilisation thérapeutique [25]. Les flavonoïdes détectés dans l'*A. herba alba* montrent une grande variation structurelle, allant des flavonoïdes communs (flavones glycosides et flavonols) jusqu'à les plus inhabituelles flavonoïdes hautement méthylées [24]. Les flavonoïdes glycosides comprennent des O-glycosides tels que quercitrine-3-glucoside, mais aussi des flavones C-glycosides qui sont rares dans le genre *Artemisia*, ainsi que dans l'ensemble des Astéraceae.

En plus des sesquiterpènes lactones et des flavonoïdes l'analyse phytochimiques a porté sur la composition des huiles essentielles de l'*Artemisia herba alba* Asso. Parmi les composants les plus importants des huiles essentielle de l'*Artemisia herba alba* Asso on trouve les monoterpènes tels que le 1,8-cineole et le terpène 4 ol [26], des santonines, des coumarines, des triterpènes pentacycliques et les tanins [27].

#### 1.7. Place d'*Artemisia herba alba* en phytothérapie

En plus de sa richesse minérale très élevée, l'armoise blanche présente un indice très recherché pour ces propriétés pharmaceutiques [19]. Elle est employée pour le traitement des troubles de l'appareil digestif. C'est une plante douée de propriétés sédatives

(abdominales), antispasmodiques et emménagogues. Ses racines sont indiquées contre certains troubles nerveux (sédatif), tics, convulsion, spasmes [28]. Elle a aussi un effet purgatif très prononcé et joue un rôle majeure dans le contrôle des vers intestinaux [29]. Les extraits à *Artemisia herba alba* ont un effet antidiabétique [29]. Ces feuilles sont utilisées en médecine traditionnelle pour soigner la bronchite et les abcès [30].

Dans une étude réalisée par DJERIDANE [31] sur l'armoise blanche Algérien, cette plante a montré une bonne activité antioxydante donc peut être considéré comme sources d'antioxydants naturels pour des usages médicaux et commerciales.

De loin le plus fréquemment cité est l'utilisation de l'*Artemisia herba alba* dans le traitement du diabète sucré [32][33][34]. Plusieurs auteurs ont rapportés sur l'effet hypoglycémiant de l'extrait aqueux d'*Artemisia herba alba* Asso (0.39 g/kg de poids corporel) sur des lapins, des rats et des souris. En plus du diabète, l'extrait aqueux d'*Artemisia herba alba* Asso est utilisé traditionnellement en Jordanie comme un antidote contre les venins de plusieurs types de serpents et de scorpions [35], et en Afrique du nord pour soigner la bronchite, l'abcès, les diarrhées, et comme vermifuge [30].

## 2. *Artemisia campestris* L

### 2.1. Caractéristiques morphologiques de la plante

Plante herbacée vivace, hermaphrodite, presque inodore, buissonnante (30-150 cm). Tiges subligneuses et couchées à la base puis ascendantes, généralement rougeâtres et glabrescentes, très ramifiées à rameaux étalés. Feuilles alternes, non charnues, carénées en dessous, plus ou moins soyeuses dans leur jeunesse, devenant glabrescentes ensuite, les inférieures pétiolées, à limbe 2-3 pennatiséqué, à segments linéaires, les autres sessiles, à limbe moins divisé, à segments étroitement linéaires, mucronulés. Inflorescence : épi de capitules ovoïdes, larges de 1,5 à 2,5 mm ; involucre glabre et luisant ; réceptacle glabre ; fleurs périphériques femelles, les autres mâles. Ces Fruit sont des akènes [36].

## 2.2. Taxonomie

**Embranchement** : spermatophyta

**Sous embranchement** : Angiospermes

**Classe** : Dicotylédones

**Famille** : Asteraceae

**Sous famille** : Radiées

**Genre** : *Artemisia*

**Espèce** : *Artemisia campestris* L.

**Nom vernaculaire** : Degoufet, Guefta.

**Nom français** : Armoise champêtre, Armoise rouge.

**Autres appellations** : Alala, Tedjouq.

POTTIER-ALAPETITE a décrit trois sous espèces en Tunisie: la sous espèce *A. campestris* ayant deux variétés, *Vulgaris* Marss et *odoratissima* (Desf) Bonn et Barr en Algérie, Battandier et Quezel ont décrit une autre variété *A. clausonis* pomel; la sous espèce *A. glutinosa* (J gay) Batt; et la sous espèce *A. canescens* LH [36].

## 2.3. Aire de répartition

Cette plante est membre de la famille des Asteraceae, elle est répandue au centre et au sud de la Tunisie (Gafsa, Matmata, Medenine et Moulares), au sud algérien (El Golea, Tiout, Batna et Ain Sefra) ; au sahara central (Hoggar et Tassili). On rencontre aussi *Artemisia campestris* L. ssp. *campestris* en Libye [15].

Elle est diploïde ( $2n = 36$ ) qui peut être trouvés de plus en plus dans des endroits secs dans la plupart de l'Europe, mais elle est absent de nombreuses îles et une grande partie du nord. L'*Artemisia campestris* est très répandue en Serbie [37]. Cette plante vivace ou bisannuelle habite une gamme de régions tempérée à travers l'hémisphère nord. Cette espèce est commune à la plupart des régions d'Europe. Elle est polymorphe et est divisé en plusieurs sous-espèces et formes [38]. L'*Artemisia campestris* c'est une plante des hauts plateaux. Elle est plus rare dans la région présaharienne [28].

## 2.4. Ecologie

L'*Artemisia campestris* pousse sur les sols rocheux, son habitat est les collines et les montagnes [36]. C'est une plante qui croit dans les champs secs, pierreux et découvert [15].

En France, cette espèce polymorphe est présente à des altitudes allant du niveau de la mer à 1800 m, à travers des lieux ouverts et sablonneux, mais surtout sur les sables maritimes de la zone méditerranéenne [39].

### 2.5. Place d'*Artemisia campestris* en phytothérapie

L'armoise champêtre contient des huiles essentielles, des glucosides, des flavones, des stérols et du tanin [28].

L'utilisation de la plante *A. campestris* L.ssp. *campestris* varie d'un pays à l'autre. En Algérie, les populations s'en servent, en décoction, comme antispasmodique ; antidiabétique ; astringent ; antidote des intoxications par morsures de scorpions. Régule la tension artérielle : antipéritique [40]. Au Japon, cette herbe est utilisée pour le traitement du diabète, et les atteintes rénales. Ailleurs, elle est utilisée en étant emménagogue ; antiépileptique ; vulnéraire ; vermifuge ; antivenimeuse [41]. En Tunisie, les feuilles de cette plante recueillies en été (août) sont largement utilisées en médecine traditionnelle en décoction pour leur action anti-venin anti-inflammatoire, propriétés antirhumatismales et antimicrobiennes [41].

En usage externe, l'*A. campestris* est un cataplasme sédatif sur le bas ventre (règles difficiles, crampes musculaires) et cicatrisant sur les blessures et les brûlures [12].

La plante a été utilisée par certaines tribus indigènes nord-américaines comme un abortif pour interrompre une grossesse difficile. La plante a été écrasée et appliquée extérieurement pour les articulations rhumatismales, l'eczéma, des contusions et des plaies. Un cataplasme des feuilles broyées a été appliqué pour les yeux endoloris. Une infusion de racines a été utilisée, en particulier sur enfants, comme un tonique pour les cheveux et pour traiter les infections du cuir chevelu [42].

### 2.6. La toxicité de la plante

Les toxines sont réparties à travers toute la plante, mais les feuilles et les tiges en contiennent les concentrations les plus élevées, la plante compte 0.04% d'huiles

essentielles,  $\alpha$ -pinène est contenu dans l'huile de turpentine avec un pourcentage de 58-65 % et 30 %  $\beta$ -pinène.

Les effets toxiques de l' $\alpha$ -pinène sont similaires à ceux de la turpentine. Ce dernier est irritant puissant de tous les tissus jusqu'au tractus intestinal et les reins, il est réputé de causer l'avortement. Pour l'Homme, la limite d'exposition à la turpentine est de 100 ppm aucun effet cumulatif n'a été enregistré pour la turpentine [43].

L'intoxication aura lieu lors de l'ingestion de jeunes pousses. Il est nécessaire de consommer de grandes quantités pour que ça soit toxique (Utiliser une dose inférieure à 15 gr de feuilles). Son essence, utilisée à forte dose provoque des convulsions. Les dromadaires et les caprins sont les plus touchés les animaux ingérant *A campestris* exposent des signes d'irritation du tract digestif associés à des diarrhées l'excrétion est critique avec possibilité de présence d'albumine, hémoglobine, et les érythrocytes. L'avortement touche les dromadaires à différentes phases de la gestation [43].

## **CHAPITRE 2**

### **LES HUILES ESSENTIELLES**

#### 2.1 Historique

Dés la plus haute antiquité, on a utilisé les propriétés thérapeutiques des huiles essentielles en Chine, au Moyen-Orient, en Grèce, en Amérique et en Egypte [44].

Souvent, toutes les civilisations et traditions ethniques ont utilisée des plantes et particulièrement les plantes aromatiques, pour se soigner [45]. Plus tard, au 19e siècle, il est connu que les travailleurs des parfumeries ont présenté une immunité presque complète durant les épidémies de choléra [46].

Il semblerait que ce soit les Egyptiens, dont l'histoire remonte à plus de 4000 ans qui furent les premiers à tirer parti du règne végétal dans un souci esthétique et spirituel. L'essence de térébenthine était déjà utilisée et tout porte à penser que certains parfums étaient déjà obtenus sous forme d'huile distillée.

Plus tard la civilisation Arabe dont Bagdad, Bassora et Damas étaient les principaux centres commerciaux, développa le commerce des épices et des aromates et donna une grande impulsion à l'Art de distillation.

L'ère industrielle a pris peu le pas sur un empirisme et développa ainsi de nouvelles techniques de distillation. Il existe aujourd'hui approximativement 3000 huiles dont environ 300 sont réellement commercialisées, destinées principalement à l'industrie des arômes et des parfums. Mais la tendance actuelle des consommateurs à rechercher une alimentation plus naturelle a entraîné un regain d'intérêt des scientifiques pour ces substances. Depuis deux décennies des études ont été menées sur le développement de nouvelles applications et l'exploitation des propriétés naturelles des H.Es dans différents domaines [47].

#### 2.2 Définition

L'huile essentielle est un principe volatil odorant que contiennent les plantes aromatiques. Il s'agit de mélanges complexes de plusieurs principes en proportion variable d'une essence à l'autre. On obtient le plus souvent les huiles essentielles par distillation,

parfois par pression (Agrumes) ou par enfleurage. Les H.E sont généralement liquides, incolores ou colorées, insolubles dans l'eau, mais solubles dans l'alcool [48].

L'association française de normalisation (AFNOR) [49] définit une huile essentielle comme étant un produit obtenu à partir d'une matière végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe frais de certains végétaux, soit par distillation à sec. L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques [49]. Par conséquent, cette définition par procédé est restrictive : elle exclut aussi bien les produits obtenus par extraction à l'aide de solvants que ceux obtenus par tout autre procédé (gaz sous pression, enfleurage) [50].

Les H.Es ont des propriétés et des modes d'utilisation particuliers et ont donné naissance à une branche nouvelle de la phytothérapie : l'aromathérapie [50].

### 2.3 Localisation et lieu de synthèse

Il n'existe pas de règles générales concernant les lieux d'accumulation des métabolites secondaires dans l'organisme végétal. Chez les plantes à essences, ce sont des cellules glandulaires, des poils épidermiques, des poches et des tubes sécréteurs qui renferment les composés terpéniques [51].

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux (racine, tige, feuille,...etc) [50]. Elles sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices et s'accumulent en général dans les cellules glandulaires spécialisées, situées en surface de la cellule et recouverte d'une cuticule [52].

Selon BRUNETON [50], les huiles essentielles sont stockées dans :

- Des cellules à l'huile essentielle des Lauracées ou des Zingibéracées.
- Des poils sécréteurs des Lamiacées.
- Des poches sécrétrices des Myrtacées ou des Rutacées.
- Des canaux sécréteurs des Apiacées ou des Astéracées.

Plusieurs catégories de tissus sécréteurs peuvent coexister simultanément chez une même espèce, voir dans un même organe [53][54].



## 2.4 Propriétés physico-chimiques

Les H.E sont des substances liquides à température ambiante, non grasses, volatiles, d'odeur très forte, solubles dans tous les solvants organiques (elles sont solubles dans l'alcool, l'éther et les huiles fixes) et très peu solubles dans l'eau, leur densité est le plus souvent inférieure à celle de l'eau [55][56]. elles s'oxydent au contact de l'air et de la lumière [57].

Le terme huile s'explique par la propriété de solubilité dans les graisses et par leur caractère hydrophobe. Le terme « essentielle » fait référence au parfum, à l'odeur plus au moins forte dégagée par la plante [52].

En raison de leur structure chimique unique, les huiles essentielles ont la capacité de pénétrer les parois cellulaires et de transporter l'oxygène, les nutriments et d'autres composés biochimiques vitaux jusqu'à l'intérieur de chaque cellule. Elles contiennent de puissants composés biochimiques qui donnent aux plantes la capacité de croître, de réparer les dommages à leur structure [46].

Actuellement nous sommes incapables de savoir leur action au sein de la plante. Plusieurs théories sont possibles: pour beaucoup de chercheurs, ce serait des déchets du métabolisme cellulaire de la plante. Pour d'autres, elles serviraient à attirer les insectes pour permettre la fécondation ou bien à les éloigner, afin de protéger la plante [55].

Les H.E semblent avoir une fonction écologique, vu le rôle de certaines d'entre elles ; aussi bien dans le domaine des interactions végétales (inhibiteurs de germination), que dans celui des interactions des pollinisateurs). Chez les plantes désertiques, les H.E jouent un rôle important dans la saturation de l'humidité indispensable à leur vie [58].

Les huiles volatiles sont les mélanges très complexes, les constituants sont principalement des monoterpènes et des sesquiterpènes de formule générale  $(C_5H_8)_n$ . les composés oxygénés dérivés de ces hydrocarbures incluent des alcools, des aldéhydes, des esters, des éthers, des cétones, des phénols et des oxydes. On estime qu'il y a plus de 1000 monoterpènes et 3000 de structures sesquiterpènes. D'autres composés incluent des phenylpropanes et des composés spécifiques contenant le soufre ou l'azote [59].

- Les terpènes

Les terpènes sont des composés issus du couplage de plusieurs unités "isopréniques" ( $C_5H_8$ ), soit deux unités pour les monoterpènes ( $C_{10}H_{16}$ ) et trois unités pour les sesquiterpènes ( $C_{15}H_{24}$ ). Ils ont la même origine métabolique. Ces composants majeurs déterminent les propriétés biologiques des huiles essentielles [60][61].

Ils sont subdivisés selon le nombre d'entités isoprènes en monoterpènes formés de deux isoprènes ( $C_{10}H_{16}$ ), les sesquiterpènes, formés de trois isoprènes ( $C_{15}H_{24}$ ), les diterpènes, formés de quatre isoprènes ( $C_{20}H_{32}$ ). Les tétraterpènes huit isoprènes qui conduisent aux caroténoïdes. Les polyterpènes ( $C_5H_8$ )<sub>n</sub> ou n peut-être de 9 à 30 [62].

Dans le cas des huiles essentielles seules seront rencontrés les terpènes les plus volatiles, c'est-à-dire ceux dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée: mono- et sesquiterpènes [50].

### Les monoterpènes

Les carbures sont presque toujours présents. Ils peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques Figure 2.3. Les monoterpènes sont volatils entraînés à la vapeur d'eau, d'odeur souvent agréable Ils constituent parfois plus de 90% de l'huile essentielle [50].

A ces terpènes se rattachent un certain nombre des substances à fonction chimique : alcools (géraniol, menthol), aldéhydes (géraniol, citronellal, sinensal), cétones (carvone, menthone,  $\beta$ -vétivone), et des esters (acétate de géranyle, acétate de linalyle, acétate de cédryle, acétate  $\alpha$ -terpinyle).

### Les sesquiterpènes

Ce sont des composés de formule brute:  $C_{15}H_{22}$ ,  $C_{15}H_{24}$ ,  $C_{15}H_{26}$  constitués de trois éléments isopréniques, disposés de façon à donner des structures mono ou polycycliques Figure 2.4. Ils se trouvent dans diverses essences naturelles [56].

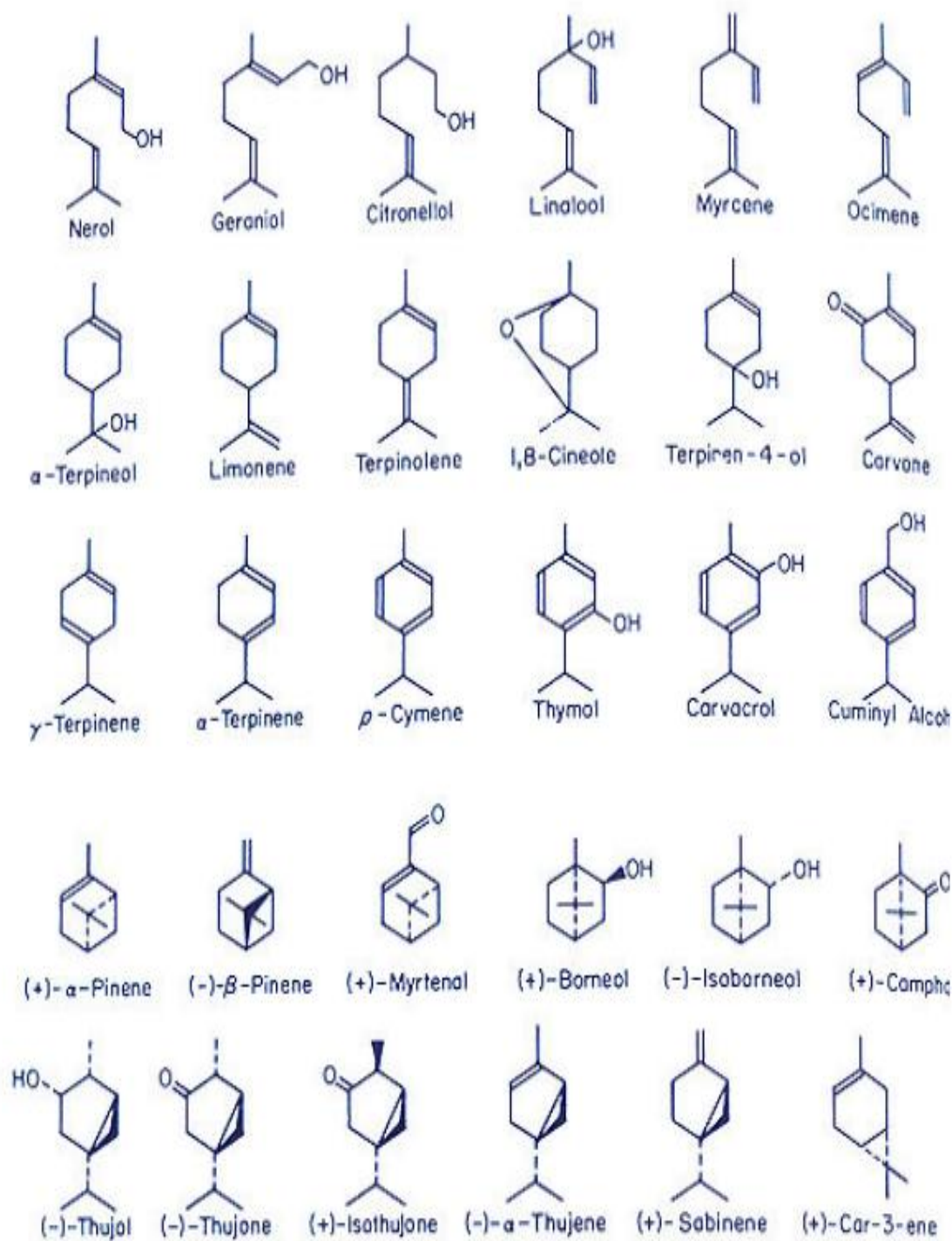
Un très grand nombre des sesquiterpènes sont des constituants habituels des huiles essentielles des végétaux supérieurs et, en tant que tels, ils peuvent intervenir dans les propriétés pharmacologiques attribuées à ces fractions volatiles [50].

### Les composés aromatiques

Les huiles essentielles renferment aussi des composés aromatiques plus particulièrement des composés «phénylpropanoïdes » dont la biogénèse est différente de celle des terpènes [63].

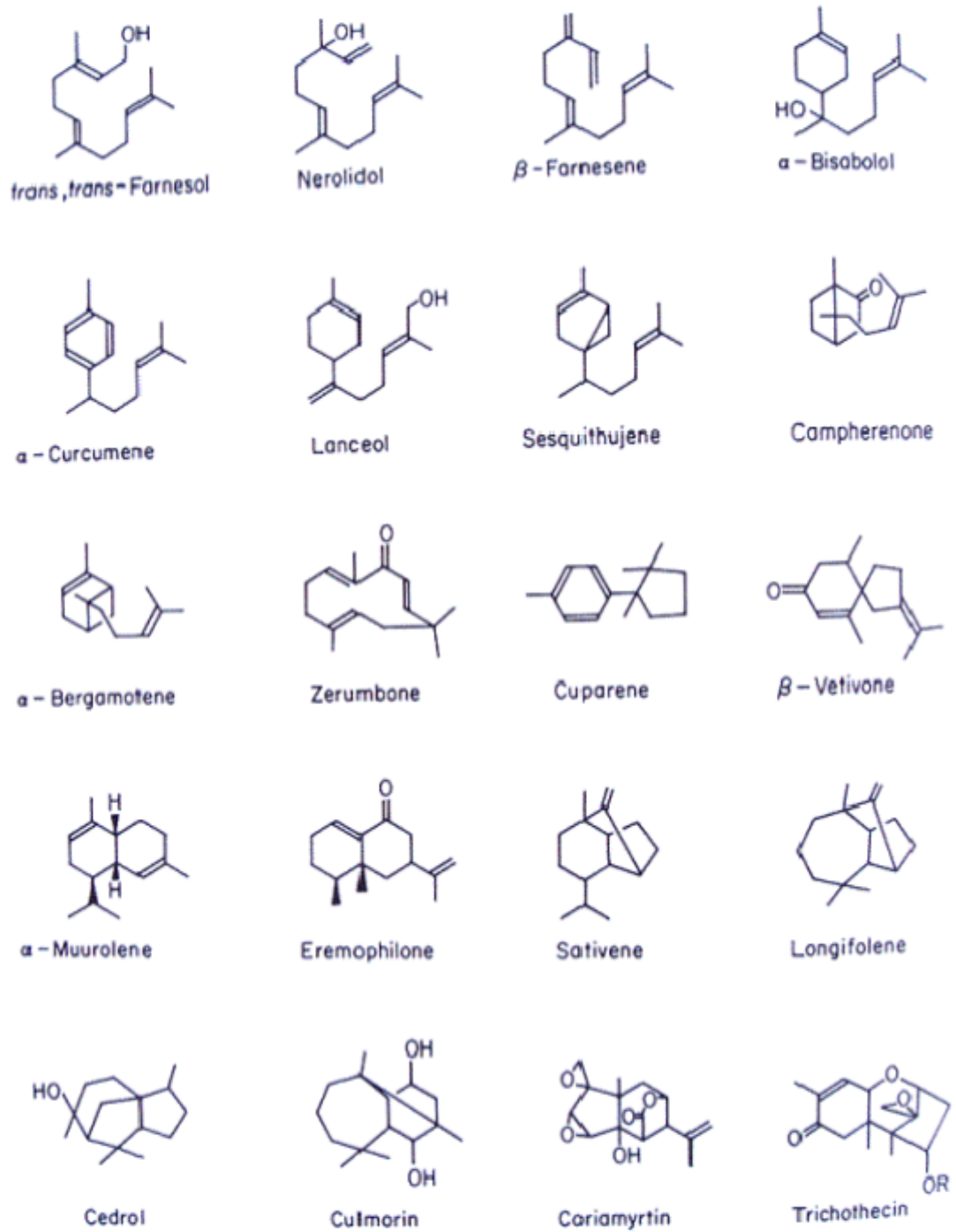
Les composés aromatiques sont très souvent, des allyl- et propénylphénols, parfois des aldéhydes, caractéristiques de certaines huiles essentielles d'Apiaceae (anis, fenouil, persil, etc). Cette classe comprend des composés odorants comme la vanilline, l'eugénol, l'anéthole, l'estragole et bien d'autres.

Ces substances sont dotées de certaines activités résumées dans le **tableau 2.1**.



**Figure 2.3** : Molécules représentatives des monoterpènes acycliques et monocycliques

[64]



**Figure 2.4 :** Principaux sesquiterpènes [64]

**Tableau 2.1 : Activités biologiques de certains composés terpéniques**

Familles	Exemples	Propriétés	Référence
Hydrocarbure Aliphatique Monoterpènes	Limonene (carvi, pin), $\alpha$ et $\beta$ -pinène (sapin)	Fongistatique Bacterostatique Insecticide Nematicide Antimutagenique Herbicide Stimulation générale	[65][66]
Sesquiterpènes	Bisabolème, alpha-humulème, beta-caryophyllène (pin)	Calmants Anti- inflammatoire Anti- allergique Antibactériens et antifongique	[67]
Phénols	Thymol (thym), carvacrol (origan), eugénol (clou de girofle)	Antioxydant Stimulantes Toniques Antiseptiques Bactéricides Fongicides Anti-virale Antiparasitaires Irritantes	[68][69] [70] [71] [72] [73]
Alcool monoterpéniques	Linalol (bois de rosé), geraniol (palmarosa), menthol (menthe poivrée), citmellol (citronnelle)	Anti-inflammatoire Antiseptiques Bactéricides Fongicides Anti-virale Anti- allergique Immunostimulants Neurotoniques	[74] [66] [67]
Alcool sesquiterpéniques	Bisabolol (matricaire), viridiflorol (niaouli), cadrol (cyprès)	Toniques et stimulants généraux Décongestionnants veineux et lymphatiques	[67]
Aldéhydes terpéniques	Citral (mélisse citronnée), citronellal (citronnelle, eucalyptus citronne) géraniale (verveine citronnée)	Antifongique Sporocidas Insecticide Antihypertensifs Anti- inflammatoire	[67]
Cétones	Carvone (carvi), menthone (menthe poivrée), camphre (romarin), thuyone (sauge)	Calmantes Antivirales Antifongiques Neurotoxiques Anti- épileptiques Dépresseurs à dose élevées	[65]

### Les composés d'origine diverses

Enfin, il existe un nombre non négligeable de composés volatils issus de la dégradation, de terpènes non volatils (c'est le cas par exemple des ionones qui proviennent de l'auto-oxydation des carotènes) et d'acides gras (les petites odorantes, comme par exemple le (3Z)-hexén-1-ol ou le décanal, qui sont obtenues à partir des acides linoléique et  $\alpha$ -linoléique) [50].

### 2.5 Les chémotypes

Le chémotype d'une H.E est une référence précise qui indique le composant biochimique majoritaire ou distinctif, présent dans l'H.E. C'est l'élément qui permet de distinguer des H.Es extraites d'une même variété botanique mais, d'une composition biochimique différente [75].

Au sein d'une même espèce de plante, la composition de l'huile essentielle des divers individus peut présenter des profils chimiques ou chémotypes différents. L'exemple le plus marquant est celui de l'espèce sauvage *Thymus vulgaris* présente dans le sud de la France. Il existe en effet six chémotypes différents pour cette seule espèce [76].

Ce polymorphisme chimique existe aussi pour bien d'autres espèces: *Origanum vulgare* [77], *Mentha spicata* [78] en sont des exemples. Il est important de noter que des huiles essentielles à chémotypes différents présenteront non seulement des activités différentes mais aussi des toxicités très variables [79].

### 2.6 Facteurs influençant la composition chimique

La composition chimique et le rendement en huiles essentielles varient suivant diverses conditions : L'environnement, le génotype, origine géographique, la période de récolte, le séchage, lieu de séchage, la température et durée de séchage, les parasites, les virus et mauvaises herbes [59][80]. C'est ainsi que l'action des huiles est le résultat de l'effet combiné de leurs composés actifs et inactifs, ces composés inactifs pourraient influencer la disponibilité biologique des composés actifs et plusieurs composants actifs pourraient avoir un effet synergique [59].

Ajouter à la complexité d'huiles volatiles [59], les proportions des différents constituants d'une huile essentielle peuvent varier de façon importante tout au long

du développement, aussi les chémotypes ou races chimiques sont très fréquents chez les plantes aromatiques exemple, on compte pour *Thymus vulgaris* ; espèce morphologiquement homogène sept chimotypes différents [58].

## 2.7. Activités biologiques

### 2.7. 1. Activité antimicrobienne

Les vertus antimicrobiennes des HEs sont connues et utilisées depuis longtemps, mais cette utilisation se basait sur des pratiques traditionnelles et des applications sans bases scientifiques précises [81].

De nos jours, leur emploi se fait sur des bases scientifiques et rationnelles puisque de nombreux travaux de recherche portent sur les propriétés antimicrobiennes des HEs des plantes aromatiques [81].

- **Activité antibactérienne :** Les H.Es les plus étudiées pour leurs propriétés antibactériennes appartiennent aux Labiatae : origan, thym, sauge, romarin, clou de girofle sont d'autant de plantes aromatiques à H.Es riches en composés phénoliques comme l'eugénol, le thymol et le carvacrol. Ces composés possèdent une forte activité antibactérienne. Le carvacrol est le plus actif de tous, reconnu pour être non toxique, il est utilisé comme agent de conservation et arôme alimentaire dans les boissons, friandises et autres préparations. Le thymol et eugénol sont utilisés dans les produits cosmétiques et, alimentaires. Ces composés ont un effet antimicrobien contre un large spectre de bactéries : *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium spp*, *Helicobacter pylori* [82].
- **Activité antifongique :** FREEMAN et CAREL [83], ont signalé que les groupes moléculaires avec les plus puissantes actions antibactériennes sont également des antifongiques efficaces, mais ils doivent être utilisés sur de plus longues périodes. Expérimentalement, les H.Es des plantes aromatiques et médicinales ont fait preuve de leur efficacité antifongique parfois même supérieure à celle des agents antifongiques commerciaux.

Une étude a été portée sur les effets antifongiques de l' H.E. de thym [84], et plus particulièrement sur les conséquences de cette huile sur l'ultrastructure du champignon *Aspergillus niger*. Elle a tout d'abord permis de déterminer grâce à la microscopie



électronique, que lorsque *A. niger* était exposé à l'H.E., celle-ci provoquait des dommages irréversibles sur la membrane cellulaire ainsi que sur les organites du champignon [85]. Alors qu'elles inhibent la germination des spores, l'élongation du mycélium, la sporulation et la production de toxines chez les moisissures [86].

L'action fongicide des H.Es des clous de girofle et d'origan a été testée sur un modèle de levure *Saccharomyces cerevisiae*. La lyse des cellules de levure a été montrée par la libération de substances absorbant à 260 nm. Des analyses au microscope électronique ont montré que la surface des cellules traitées par les H.E. d'origan et de clous de girofle était significativement endommagée [87].

➤ **Activité antivirale :** Les virus sont généralement fortement sensibles aux molécules aromatiques des H.Es telles que les monoterpénols et les monoterpénals. De nombreuses pathologies virales sévères traitées avec des H.Es ont montrées des améliorations importantes. Récemment, une étude in vitro a montré l'effet antiviral de l'HE d'origan et du girofle sur le virus Type 1 de l'herpès simplex ainsi que sur le virus de la maladie de Newcastle [88]. L'effet de l'huile de *Melaleuca alternifolia* (Tea tree oil) et celle d'eucalyptus d'origine australienne ont été testées sur le virus de l'herpès simplex dans des cultures cellulaires [89].

#### 2.7.1.1. Activité biologique

L'activité biologique d'une huile essentielle est liée à sa composition chimique, aux groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcool, phénol, composés terpéniques et cétoniques) et à leurs effet synergique. Ainsi la nature des structures chimiques qui la constituent et leurs proportions [90].

L'activité des huiles essentielles sont souvent réduites à l'activité de ses composés majoritaires. Il est cependant probable que les composés minoritaires agissent d'une manière synergique. De cette manière la valeur d'une huile essentielle tiennent à l'intégralité de ses composants et non seulement à ses composés majoritaires [65].

Les composés chimiques de plus grande efficacité et à plus large spectre sont des phénols (thymol, carvacrol et eugénol) suivit des alcools (géraniol, linalol), des aldéhydes (geranial, citronellal) et enfin des cétones (thuyone, puligone) [91].

### 2.7.1.2. Mécanismes d'action antibactérienne

L'activité antimicrobienne des HEs a fait l'objet d'un grand nombre de publications à l'échelle internationale [92][93][94]. Cependant, la majorité des travaux cités dans ces publications s'arrêtent au niveau de la mise en évidence de l'activité antimicrobienne de ces HE [95][96]. Les études sur les mécanismes d'action de cette activité sont en nombre négligeable.

Jusqu'à présent, il n'existe pas d'étude qui puisse nous donner une idée claire et précise sur le mode d'action des HEs. Etant donné la complexité de leur composition chimique, tout laisse à penser que ce mode d'action est assez complexe et difficile à cerner du point de vue moléculaire. Il est très probable que chacun des constituants des HE ait son propre mécanisme d'action [81].

Quelques investigations sur le mécanisme d'action antimicrobienne des HE ou de leurs constituants ont été menées par différents auteurs.

RAYOUR [81] a examiné le mécanisme d'action des H.E. des Clous de girofle et d'origan (*Origanum vulgare*) simultanément avec ceux de deux de leurs composants, le thymol et l'eugénol, sur des bactéries: *E. coli* et *Bacillus subtilis* et qui ont été utilisées respectivement comme modèles de bactérie Gram+ et Gram-. Les deux H.Es tout comme leurs deux composants ont été capables d'induire une lyse cellulaire. Cette action a été démontrée par la libération de substances absorbantes à 260 nm. Cette libération de substances associée à la rapide mortalité bactérienne pourrait être la conséquence de lésions sur les enveloppes induites par les agents antibactériens. L'utilisation d'un microscope électronique a permis de montrer que les H.Es attaquaient en même temps les membranes et les parois cellulaires.

Les travaux de BURT [90] ont montré qu'une H.E. active exercera son pouvoir antimicrobien par son interférence avec la bicouche lipidique de la cellule cible grâce à sa propriété hydrophobe, ce qui entraîne une perturbation de la perméabilité et perte des constituants de la cellule. En plus, cette réaction varie en fonction de la nature de la bicouche lipidique, ce qui explique la résistance des bactéries Gram- [97]. Dans la même démarche d'étude, GORDON et ses collaborateurs [98] et MAHMOUD et ses collaborateurs [97] ont suggéré que l'effet antimicrobien qu'exercent les H.Es pourrait être expliqué par la destruction de certains systèmes enzymatiques incluant ceux qui participent

dans la production d'énergie cellulaire et la production des composés structuraux. MAHMOUD et ses collaborateurs [97][99], quant à eux, ont avancé l'hypothèse d'inactivation et destruction du matériel génétique et, enfin CAILLET et ses collaborateurs [86] ont signalé que les H.Es empêchent la multiplication des bactéries, leur sporulation et la synthèse de leurs toxines.

Dans une autre étude qui a été réalisée par FREEMAN et CAREL [83], l'H.E. d'arbre à thé (*Leptospermum citratum*) a provoqué des fuites d'ions potassium (K<sup>+</sup>) au niveau des membranes cellulaires d'*E. coli* et *S. aureus*. Cette fuite de K<sup>+</sup> est la toute première preuve de l'existence de lésions irréversibles au niveau de la membrane de la bactérie. Le thymol, le carvacrol, des composants actifs d'H.E rendent perméable la membrane des bactéries, un effet précurseur de leur mort. Les H.Es ont donc bien des propriétés bactéricides.

D'après CAILLET et ses collaborateurs [86], l'action antimicrobienne des H.Es se déroule en trois phases:

- Attaque de la paroi bactérienne par l'H.E., provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires;
- acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure;
- destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie.

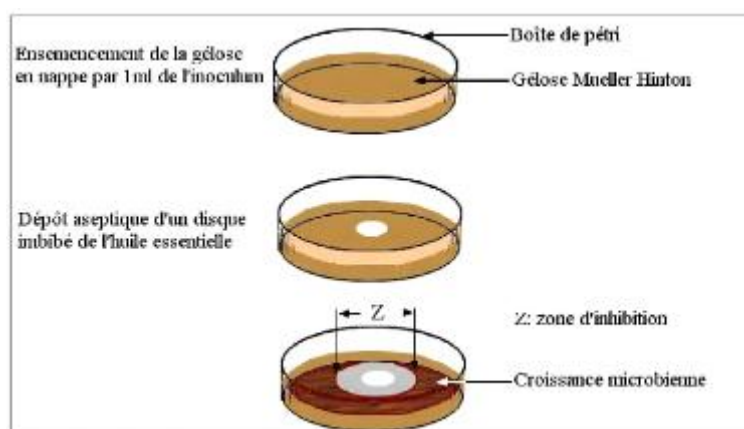
#### 2.7.1.3. Méthodes de détermination de l'activité antimicrobienne des H.Es

La technique de détermination du pouvoir antimicrobien des H.Es a une grande influence sur les résultats. Les difficultés pratiques viennent de l'insolubilité des constituants des H.Es dans l'eau, de leur volatilité, de la nécessité de les tester à de faibles concentrations et, des problèmes de standardisation des méthodes [100].

##### 2.7.1.3.1. Aromatogramme

L'aromatogramme est basée sur une technique utilisée en bactériologie médicale, appelée antibiogramme ou méthode par diffusion en milieu gélosé ou encore méthode des disques figure 2.5. Cette méthode a l'avantage d'être d'une grande souplesse dans le choix des H.Es testées, de s'appliquer à un très grand nombre d'espèces bactériennes, et d'avoir été largement évaluée par 50 ans d'utilisation mondiale [101].

La technique consiste à utiliser des disques de papier imprégnés des différentes substances à tester, puis déposés à la surface d'une gélose uniformémentensemencée avec une suspension de la bactérie à étudier. Après incubation, les colonies se développent à la surface de la gélose laissant des zones vierges autour des disques appelée zone d'inhibition. Plus le diamètre de la zone d'inhibition est grand, plus la souche est sensible à la substance testée, plus il est petit plus la bactérie est résistante. Le diamètre de ces zones d'inhibition est proportionnel à l'activité bactériostatique de l'HE sur le germe testé. On peut exprimer cette activité soit en indiquant directement le diamètre de la zone d'inhibition en millimètre, soit en traduisant en croix le degré d'activité [102].

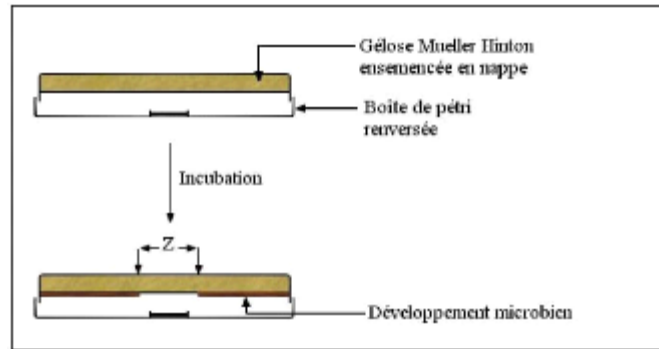


**Figure 2.5:** Illustration de la méthode d'aromatogramme [94].

#### 2.7.1.3.2. Technique de microatmosphère

Le protocole des microatmosphères est techniquement proche de celui des aromagrammes. Cette méthode en boîte de Pétri constitue une première approche pour l'étude de l'activité antimicrobienne des vapeurs de produits volatils [81].

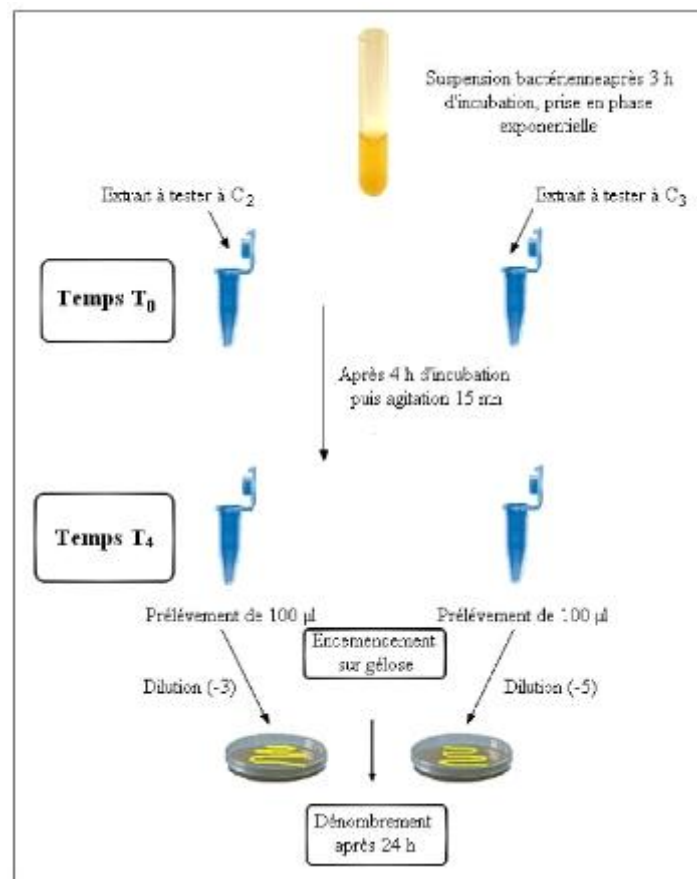
C'est une technique d'étude en phase vapeur. Son principe est d'ensemencer une boîte de Pétri avec les germes tests, tandis que l'on dépose quelques gouttes d'HE sur un papier filtre au fond et au centre du couvercle. La boîte est incubée couvercle en bas. Il se produit une évaporation des substances volatiles et on lit après incubation, la croissance des germes ou l'inhibition de leur croissance figure 2.6.



**Figure 2.6:** Illustration de la méthode de microatmosphère [94].

### 2.7.1.3.3. Technique par contact direct

La technique par contact direct consiste à mettre en présence l'H.E. et les micro-organismes, puis à observer la croissance de ces derniers figure 2.7. Le contact peut avoir lieu en milieu gélosé ou liquide [100].



**Figure 2.7:** Schéma représentant la technique de contact direct [94].

#### 2.7.1.3.4. Méthode de diffusion en puits ou en cylindre

C'est une méthode qui a été proposée par Cooper et Woodman en 1946, et reprise par la suite par Schroder et Messing en 1949, elle assure une diffusion radiale de l'H.E. à partir d'un puits en donnant une zone d'inhibition claire et facilement mesurable. La méthode consistait à découper un trou circulaire vertical dans la gélose et à y verser une solution d'H.E. de concentration connue. L'H.E. diffuse radialement créait une zone d'inhibition circulaire à la surface de la gélose préalablementensemencée avec la suspension bactérienne [67].

#### 2.7.1.3.5. Méthode de dilution

Les H.Es à tester peuvent également être directement mélangées en concentration connue au milieu de culture, qu'il soit solide ou liquide (exige la dispersion homogène par un émulsifiant). Le milieu est ensuite inoculé à un taux déterminé de microorganismes, après incubation, on note la présence ou l'absence de culture. La lecture peut-être visuelle ou à l'aide d'un spectrophotomètre, le degré d'inhibition est en rapport avec la turbidité du milieu [103].

#### 2.7.1.4. Facteurs influençant l'activité antimicrobienne

Plusieurs paramètres influencent la détermination de l'activité antimicrobienne des HEs ou de leurs composants actifs, tels que la méthode d'évaluation d'activité antimicrobienne, l'effet de la matrice biologique, le type et la structure moléculaire des composants actifs, la dose ajoutée, le type des microorganismes ciblés et leur éventuelle adaptation aux HEs [104].

Les propriétés antimicrobiennes des HEs diffèrent en fonction de la matrice à laquelle elles sont ajoutées, ou du fait du contact avec les macromolécules comme les lipides ou les protéines qui protègent les bactéries de l'action des HEs [105]. Ainsi les HEs diluées dans la phase lipidique des aliments seront moins efficaces sur les bactéries de la phase aqueuse [106]. Les aliments à faible teneur en eau empêchent également l'accès des HEs aux sites cible sur la membrane des cellules bactériennes. Par ailleurs, une réaction chimique entre les protéines et les groupes fonctionnels des HEs réduit la disponibilité des molécules actives : ceci a été observé pour le carvacrole, conduisant à une protection relative de *Bacillus cereus* contre les HEs dans le lait [107].

### 2.7.1.5. Détermination de l'effet bactériostatique ou bactéricide

La détermination de l'effet bactéricide ou bactériostatique d'une H.E est réalisée en procédant à un repiquage des zones d'inhibition formées et ne présentant aucune croissance bactérienne visible à l'œil nu sur milieu de culture.

- ✓ Si il y a croissance bactérienne, l'H.E a un effet bactériostatique sur la souche testée.
- ✓ Si il au contraire il y a absence de croissance bactérienne, l'H.E présente un effet bactéricide vis-à-vis de cette souche.

La CMI est définie comme étant la plus basse concentration capable d'empêcher une croissance bactérienne visible. La CMI n'est pas totalement bactéricide et une partie de l'inoculum est capable de se développer après disparition du composé inhibiteur [108].

La CMB est la petite concentration de l'agent inhibiteur ne laissant subsister que 0,01% ou moins de survivants de l'inoculum initial après 18 heures de culture à 37°C. cette valeur caractérise l'effet bactéricide de l'H.E [109].

## 2.8. Méthodes d'extraction

L'obtention des huiles essentielles fait appel à deux méthodes générales :

- soit l'entraînement à la vapeur d'eau et l'hydrodistillation.
- soit l'expression à froid des écorces ou zestes de fruits de citrus [110].

En général le choix de la méthode d'extraction dépendra de la nature du matériel végétal à traiter (graines, feuilles, ramilles), de la nature des composés (par exemple, les flavonoïdes, les H.Es, les tanins), le rendement en l'huile et la fragilité de certains constituants des huiles aux températures élevées.

### 2.8.1. Distillation

#### ✓ **Hydrodistillation**

L'hydrodistillation simple consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter dans un, alambic rempli d'eau qui est ensuite portée à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par différence de densité [50].

#### ✓ **Distillation à vapeurs saturées**

La plante est placée sur une grille perforée au-dessus de la base de alambic, et

n'est pas en contact avec l'eau [111]. Les particules de vapeur d'eau, se dirigeant vers le haut, font éclater les cellules contenant l'essence et entraînent avec elles les molécules odorantes. La vapeur passe ensuite à travers un récipient réfrigérant où la température diminue, provoquant le déclenchement des molécules huileuses des particules de vapeur, qui se condense en eau. L'huile et l'eau se séparent du fait de leur poids spécifique différent [112].

#### ✓ **Hydrodiffusion**

Consiste à pulser de la vapeur d'eau à très faible pression (0,02-0,15 bar) à travers la masse végétale, du haut vers le bas. La composition des produits obtenus est qualitativement sensiblement différente de celle des produits obtenus par les méthodes classiques. Le procédé permet un gain de temps et d'énergie [50].

#### 2.8.2. Expression

C'est une technique simple où les écorces des agrumes sont pressées à froid pour extraire leurs huiles essentielles. Ce procédé consiste à broyer, à l'aide de presses, les zestes frais pour détruire les poches afin de libérer l'essence. Le produit ainsi obtenu porte le nom d'essence, car il n'a subi aucune modification chimique [113].

#### 2.8.3. Extraction assistée par micro-ondes

Dans ce procédé récemment développé, la plante est chauffée sélectivement par un rayonnement micro-ondes dans une enceinte dont la pression est réduite de façon séquentielle. Très rapide et peu consommateur d'énergie, le procédé livre un produit qui, le plus souvent, est de qualité supérieure à celle du produit d'hydrodistillation, traditionnelle (temps dix fois plus rapide et température plus basse) [50][114].

#### 2.8.4. L'extraction aux solvants volatils

Cette technique est elle aussi utilisée avec des fleurs ne supportant pas la chaleur, la distillation ne convient que pour les végétaux dont le rendement en huile essentielle est suffisamment important, les solvants très volatils par exemple l'éther, et L'hexane qui s'évaporent rapidement sont employées. Le solvant lave la matière première qui subira après décantation et concentration, une distillation partielle. Ce solvant volatil est alors séparé de la "concrète" par filtrage, puis glaçage de  $-12^{\circ}\text{C}$  à  $-15^{\circ}\text{C}$ . La



précieuse substance ainsi obtenue est à nouveau filtrée et concentrée à faible pression. [58][115].

#### 2.8.5. L'extraction au CO<sub>2</sub> supercritique

Il s'agit du procédé le plus récent d'extraction au froid des matières premières végétales utilisant le gaz carbonique : le CO<sub>2</sub>. Sous pression et à température supérieure à 31°C, le gaz carbonique se trouve dans un état "supercritique", la matière végétale est chargée dans l'extracteur puis le CO<sub>2</sub> est introduit sous pression et réfrigéré. Le mélange est recueilli dans un vase d'expansion. La pression y étant réduite, le CO<sub>2</sub> reprend sa forme gazeuse et est complètement éliminé. L'extrait végétal est isolé, les matières premières ainsi obtenues sont proches du produit naturel d'origine sans trace résiduelle de solvant [58][115].

#### 2.9. Méthodes de caractérisation des huiles essentielles

L'analyse des huiles essentielles est une opération délicate qui nécessite la mise en oeuvre de plusieurs techniques [116].

##### 2.9.1. La chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La chromatographie en phase gazeuse s'applique à des échantillons gazeux ou susceptibles d'être vaporisés sans la décomposition dans l'injecteur. La phase mobile est alors un gaz (hélium, azote, argon ou hydrogène), appelé gaz vecteur qui balaie en permanence la colonne. Cette dernière placée dans four thermo staté, est un tube de faible section enroulé sur lui-même et contenant la phase stationnaire. Un grand choix des détecteurs permet l'analyse sélective et parfois l'identification de mélange très complexe comme dans le cas des huiles essentielles. Si la phase stationnaire est un liquide non ou peu volatil, possédant des propriétés de solvant vis à vis des composés à séparer, on parle de chromatographie gaz-liquide ou chromatographie de partage ; si la phase stationnaire est un solide adsorbant (silice, alumine,...), c'est la chromatographie gaz- solide ou chromatographie d'adsorption [117].

##### 2.9.2. La spectrométrie de masse (SM)

Le spectromètre de masse permet l'identification et la quantification des composés. Il existe de nombreux types de spectromètres de masse ; tous ont en communs trois éléments : une source, un analyseur et un détecteur. La source est la partie du spectromètre

de masse où sont produits des ions gazeux à partir des molécules introduites. En couplage avec le chromatographe en phase gazeuse, où les composés sont élués arrivent au spectromètre à l'état gazeux, les sources utilisées sont dites à "ionisation électronique" (IE) ou à "ionisation chimique" (IC). La source est maintenue à une température élevée (généralement comprise entre 100 et 250°C) pour éviter la condensation des substances [118]. Les ions sont ensuite dirigés vers la partie analytique de l'appareil.

### 2.9.3. Couplage CPG/SM

La première approche, qui est la plus couramment employée, est l'utilisation du couplage d'une technique chromatographique, généralement la Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) permettant l'individualisation des constituants, avec une technique spectroscopique, la Spectrométrie de Masse (SM) et/ou la spectrométrie Infra-Rouge par Transformée de Fourier (IRTF), permettant l'identification des constituants par comparaison des données spectrales avec celles de produits de référence contenus dans des bibliothèques de spectres. Les données spectrales sont systématiquement associées à l'utilisation des indices de rétention, qui sont calculés à partir des temps de rétention d'une gamme étalon d'alcane. Pour faciliter l'identification des composés minoritaires les huiles essentielles peuvent être soumises à un fractionnement par chromatographie sur colonne ouverte.

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) et par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM) ont été utilisées par plusieurs auteurs LAHLOU [65], LOZIENE & VENSKUTONIS [68], BOUCHRA et al [119], RASOOLI & ABYANEH [120].

Le couplage CPG/SM est la technique la plus utilisée dans le domaine des huiles essentielles. Il permet de connaître, dans la grande majorité des cas, la masse moléculaire d'un composé et d'obtenir des informations structurales relatives d'une molécule à partir de sa fragmentation. Dans la source d'ionisation, les molécules sont bombardées à l'aide d'électrons, conduisant ainsi à la formation des ions en phase gazeuse. Les ions sont ensuite dirigés vers la partie analytique de l'appareil. Le faisceau d'ions ayant traversé l'analyseur de masse, est ensuite détecté et transformé en un signal utilisable. Pour ce faire, il existe différents types de détecteurs capables de transformer un courant ionique faible en un signal mesurable. Toutefois, les détecteurs les

plus courants sont les multiplicateurs d'électrons ou de photons, permettant l'augmentation de l'intensité du signal détecté.

Finalement, l'ordinateur enregistre les données provenant du spectromètre de masse et les convertit en valeurs de masses et d'intensités des pics et en courant ionique total. Il permet l'examen des données enregistrées et leur manipulation : spectres de masse, chromatogrammes reconstitués, soustraction d'un spectre par rapport à un autre, calcul d'une moyenne sur plusieurs spectres, etc... Les spectres de masse ainsi obtenus sont ensuite comparés avec ceux des produits de référence contenus dans les bibliothèques informatisées disponibles (NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, Wiley Registry of Mass Spectral Data, contenant plusieurs milliers de spectres, Knig-Joulain, intitulée « Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils » contenant plus de 1200 composés) [116].

#### 2.10. Les huiles essentielles d'*A. herba alba* Asso

Au cours des dernières décennies les études sur l'*A. herba alba* ont porté sur ses huiles essentielles, leur composition dans différentes parties du monde, il a révélé un haut niveau de polymorphisme ce qui conduit à la définition de plusieurs chémotypes [29]. Plusieurs études mettent en évidence une huile essentielle avec plus de 100 constituants identifiés, majoritairement des monoterpènes, dont la composition varie qualitativement et quantitativement selon l'origine.

Dans une étude visant à révéler les raisons de l'utilisation de cette plante, l'extrait de l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* Asso a été testé contre différentes bactéries qui causeraient des troubles intestinaux, ainsi que sur des lapins afin de déterminer l'activité antispasmodique de cet extrait. L'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* Asso a montré une activité antibactérienne contre plusieurs bactéries telle que l'*Escherichia coli*, *Shigella sonnei* et la *Salmonelle typhose*. Cette activité a été assimilée à linalool, pinocarvèneol et surtout terpène 4-ol. L'effet antispasmodique de l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* Asso a été expérimentalement 100 - 1000 fois plus élevé que l'effet antibactérien observé [122]. Une action antifongique a été mise en évidence [121].

### 2.10. Les huiles essentielles d'*A.campestris* L

L'huiles essentielles d'*Artemisia campestris* ont été étudiés par plusieurs auteurs et ont été trouvés pour contenir différents composés tels que l'alpha et le bêta-pinènes, p-cymène, caryophyllène oxyde, spathulenol, le limonène, le déhydro-1, 8 - cinéole, Cadin-4-en-7-ol, le gamma-terpinène, (Z)-bêta- ocimène, aromadendrene, germacrène D, bicyclogermacrene, myrténol, p-cymen-8-ol, le gamma- cadinène, ar-curcumene, le delta-cadinène, calamenene,alpha-muurolene, la gamma-muurolene, la gamma-cadinène,bisabolène et endoperoxyde, (Z, E)-farnesol, et Cédrol verbénone [123][124][125]. Extraits de solvants et d'huiles essentielles d'*Artemisia campestris* ont été démontré comme antioxydant, hépatoprotecteur, antibactérien, antiviral, insecticides. [126][31][43][127]

## CHAPITRE 3

### MICROORGANISMES ETUDIÉS

#### 3.1. Les bactéries cibles

##### 3.1.1. Escherichia coli

- **Caractères bactériologiques**

Escherichia coli est l'espèce type du genre Escherichia des entérobactéries. Appelée communément "colibacille" c.-à-d. "bacille à côlon", cette espèce qui a fait l'objet d'un très grand nombre d'études constitue le modèle des bacilles à Gram- aérobies. La plupart des E. coli se multiplient rapidement (18 à 24 h) sur les milieux habituels. Les colonies ont en moyenne 2 mm de diamètre, elles sont rondes, plastiques et à bords réguliers [127].

- **Habitat et pouvoir pathogène**

C'est l'une des espèces bactériennes les plus souvent rencontrées en pathologie humaine [128]. Cette bactérie est connue depuis longtemps comme commensale du tube digestif (présente à raison de 10<sup>7</sup> à 10<sup>9</sup> corps bactériens/g de selle des anaérobies) et pathogène pour l'appareil urinaire et qui se transmet par voie orofécale. Certaines souches d'E. coli sont capables de causer des dommages au niveau de la muqueuse digestive se traduisant par un syndrome infectieux [129].

Les études épidémiologiques font appel à la sérotypie, la lysotypie, et aux méthodes génétiques pour distinguer les différents types d'E. coli. Mais il n'existe pas de marqueurs phénotypiques spécifiques permettant de séparer les souches pathogènes des souches non pathogènes [130].

Les Enterobacteriaceae (Salmonella, Shigella, E. coli) se manifestent toutes sur les produits alimentaires par suite de contamination à partir du réservoir animal/humain. Cette contamination est associée à la contamination fécale ou à la pollution des eaux, ou à la contamination directe des produits au cours de la préparation. Il en résulte que la lutte contre les maladies provoquées par les Enterobacteriaceae passe nécessairement par une bonne hygiène personnelle et de l'éducation sanitaire du personnel chargé de manipulation des aliments [130].

Les aliments incriminés sont: l'eau (dans certains pays), les viandes et le lait cru. La durée d'incubation est de 3 à 9 jours pour provoquer des gastro-entérites peu graves, diarrhées abondantes et liquides [127]. En raison de leur sensibilité à la chaleur. Leur présence sur ou dans des aliments cuits indique une contamination après traitement thermique .

### 3.1.2. *Bacillus subtilis*

- **Caractères bactériologiques**

C'est une bactérie Gram positif, bâtonnet de 3 à 7 µm de long, ayant des spores ellipsoïdales non déformantes, aérobie ou anaérobie facultatifs, selon les espèces.

*Bacillus subtilis* est une cellule procaryote. Il est entouré par une paroi de la cellule, composée de grandes quantités de peptidoglycane [131].

Il a été le premier à Gram positif des bactéries dont le génome séquencé. *B. subtilis* contient un seul chromosome circulaire. Il se compose de 4.214.810 paires de bases. Actuellement, *B. subtilis* est un microorganisme significatif dans le domaine de la recherche scientifique, ainsi que dans les biotechnologies et l'industrie. Les scientifiques utilisent souvent des *B. subtilis* comme organisme modèle [132].

- **Habitat et pouvoir pathogène**

*Bacillus subtilis* est un agent de toxi-infections alimentaires chez l'Homme, qui se traduit par des vomissements ou des diarrhées [133].

Certaines espèces sont des pathogènes opportunistes notamment pour les individus débilisés. Les *Bacillus subtilis* sont également fréquemment en cause dans les infections oculaires succédents à des traumatismes accidentels ou chirurgicaux. Il est parmi les espèces le plus souvent incriminées.

*Bacillus subtilis* a été isolé, chez l'homme, lors d'endocardites, de pneumonies, de bactériémies, de septicémies, d'infections oculaires, il est responsable de quelques cas de toxi-infections alimentaires [134].

*B. subtilis* puisse contaminer certains aliments, tels que le cacao et les épices, il cause rarement des intoxications alimentaires. Les *B. subtilis* produisent une toxine extracellulaire, la subtilisine. Subtilisine peut entraîner des réactions allergiques chez certaines personnes, cependant, la réaction allergique ne se produira après une exposition prolongée et répétée [132]. *B. subtilis* réside principalement dans le sol, y compris les sols pauvres en nutriments. Grâce à son association avec les particules du sol, il est aussi

inévitablement transféré aux plantes, aliments, animaux et même des habitats marins et d'eau douce [132].

*Bacillus subtilis*, c'est une bactérie vivant dans le sol à des températures modérées (5°C-65°C). Elle est capable de former des spores, qui lui permettent de survivre longtemps dans des conditions extrêmes telles que la dessiccation, la chaleur ou les radiations. La bactérie est aussi capable d'affronter des situations telles que les stress osmotiques, oxydatifs, acides ou les chocs thermiques [135].

### 3.1.3. *Micrococcus luteus*

- **Caractères bactériologiques**

*Micrococcus luteus* est une bactérie Gram-positives, de 0,05 à 3,5 microns de diamètre, qui est le plus souvent dans les muqueuses telles que les cavités nasales, les voies respiratoires supérieures, et la muqueuse de la bouche. Si nous étions à briser le mot *Micrococcus*, ce serait comme suit: Micro, pour microscopiques; coccus pour la forme sphérique de l'organisme; luteus pour "jaune" [136].

Cette bactérie, qui est souvent utilisé pour des études pédagogiques, produit des colonies jaunes brillantes sur gélose nutritive. *M. luteus* a des nombreuses caractéristiques biologiques, y compris sa capacité à montrer la dormance, sans formation de spores. Bien qu'il puisse survivre dans des conditions extrêmes, comme les basses températures et à la famine [137].

- **Habitat et pouvoir pathogène**

*M. luteus* se trouve principalement dans les environnements où la température se situe autour de 37 ° C car c'est la température à laquelle son milieu habituel est connu pour être (peau / cavité nasale). Il pousse aussi dans la bière, et se trouve dans le sol, mais sa durée de vie est limitée dans le sol. *M. luteus* est connu pour sa croissance dans les produits laitiers et peut être transmis via la consommation de lait [138].

Cette bactérie se retrouve également dans la poussière, le sol et l'air que nous respirons, et fait partie de la flore cutanée humaine. Il est maintenant considéré comme un pathogène opportuniste, surtout chez les patients immunodéprimés. Il est également responsable d'infections nosocomiales. Comme il est un commensal de la peau et des cavités nasales, elle est souvent négligée en tant que source d'infection clinique [139].

*Micrococcus* n'est pas considéré comme un agent pathogène, mais chez les personnes ayant un système immunitaire compromis, tels que les nouveau-nés ou les patients atteints du SIDA, *M. luteus* peut causer des infections de la peau qui produisent les éruptions prurigineuses, parfois avec ulcération centrale, accompagnée de fortes démangeaisons [138].

### 3.2. Les champignons cibles

#### 3.2.1. Le genre *Aspergillus*

C'est un genre appartenant à la classe des Ascomycètes. Le thalle, hyalin ou coloré, présente un mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores dressés, terminés en vésicule [140].

Ce genre comprend environ 185 espèces réparties en 18 groupes morphologiquement, génétiquement et physiologiquement proches [140][141]. Une vingtaine d'espèces est impliquée dans des pathologies animales et humaines.

Les *Aspergillus* ont une large répartition géographique, mais sont plus souvent associés aux régions à climat chaud [142]; ils se développent sur la matière organique en décomposition, dans le sol, le compost, les denrées alimentaires, les céréales. De nombreuses espèces d'*Aspergillus* sont présentes dans l'environnement humain, notamment dans la poussière et l'air [143].

La majorité des *Aspergillus* poussent à 22-25°C [143].

Les *Aspergillus* forment des colonies souvent poudreuses ou granuleuses. La couleur de colonies permet une orientation rapide dans l'identification d'espèces : gris-vert pour *A. fumigatus*, vert-jaune pour *A. flavus*. Le revers de la colonie est incolore ou jaune, mais il peut brunir ou rougir avec l'âge [144].

Les *Aspergillus* sont des champignons filamenteux, de type moisissure, dont la colonie se présente sous forme duveteuse. Le thalle, hyalin, présente un mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores dressés, terminés en vésicule [145].

Les *Aspergillus* sont capables de se développer dans le sol et les détritux, dans les composts et sur les végétaux malades, la plupart des *Aspergillus* sont saprophytes. Ils colonisent les végétaux déjà abîmés par des blessures, des piqûres d'insectes ou des attaques d'autres champignons. Mais ils sont aussi présents sur la surface des graines. Dans les mauvaises conditions de stockage, ces champignons peuvent évoluer et devenir des parasites [146]. Les champignons appartenant à ce genre sont responsables de maladies chez l'homme et les animaux (aspergillose pulmonaire, allergies ou



mycotoxiques). Cependant ils sont aussi capables de produire des acides organiques et des pigments utiles en alimentation et en industrie [146].

### 3.2.1.1. *Aspergillus flavus*

Ce champignon est facilement isolé sur milieu de Sabouraud, les colonies sont typiquement vert-jaune (d'abord blanche, puis jaune, et enfin vert-jaune). Leur aspect est généralement granuleux dans les zones centrales et plus poudreux en périphérie. Le verso est de couleur variable puisque, selon les isolats, il est presque incolore, rosé, ou brun-rouge. Cette espèce a une croissance rapide (2 à 3 jours). Il se développe entre 10 et 42°C (voire 48°C exceptionnellement) avec un optimum thermique à 37°C. Son développement est inhibé par l'actidione [147].

Ce champignon est présent dans toutes les régions du globe, mais on le trouve plus fréquemment dans les zones tropicales et subtropicales. On le trouve dans différents types de sols, et plus particulièrement dans les sols cultivés. Dans les zones tropicales, il se développe dans le fruit de l'*Arachis hypogea* (Arachide), c'est pourquoi une attention toute particulière doit être accordée à la contamination des produits alimentaires qui en dérivent, car de nombreuses souches peuvent produire des aflatoxines. Ce champignon se développe également souvent sur les graines de céréales (maïs, avoine...). [147].

*Aspergillus flavus* colonise toutes sortes de matières organiques en décomposition, sur les denrées alimentaires. Il élabore divers antibiotiques et des composés très toxiques et carcinogènes comme les aflatoxines, ces derniers posent un risque pour la santé humaine à cause de leur contamination extensive sur le maïs, coton, épices et cacahuète [145].

*Aspergillus flavus* est le principal producteur d'aflatoxines et cancérigènes connus. La présence de ce champignon et les aflatoxines est une préoccupation énorme en termes de sécurité alimentaire [148]. L'Aflatoxine B<sub>1</sub> est particulièrement le plus important, parce qu'il est très hépatocancérigène, autres composés toxiques qui sont produites par l'*Aspergillus flavus* (Stérigmatocystin, acide cyclopiazonique, acide Kojique, acide nitropropionique, aspertoxine, aflatrem, gliotoxine et l'acide aspergillique) [149].

Pour l'être humain l'*Aspergillus flavus* est responsable d'une infection intramusculaire ou l'infection du système nerveux central et il est l'un des agents d'infections pulmonaire, (d'endocarditis) de (Kératitits) de (Scleritis) la sinusite et l'aspergillose cutané dans le cas des patients ont (immunocompromised patients) [150].

### 3.2.1.2. *Aspergillus carbonarius*

*Aspergillus carbonarius* est un champignon filamenteux saprophyte qui fait partie des Deutéromycètes (champignons imparfaits, reproduction asexuelle), ordre des Hyphomycetes, famille des Moniliaceae. Il possède un thalle à mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores dressés, non ramifiés, terminés en vésicule. [151].

*A. carbonarius* appartient à la section Nigri [152]. Depuis peu, cette section est considérée très importante d'un point de vue ochratoxigénicité grâce à certains de ses représentants dont *A. niger* et *A. carbonarius* [153].

Au sein de la section Nigri, *A. carbonarius* est l'espèce la plus distincte [153]. Cette distinction est à la fois phénotypique, biochimique et moléculaire [154]. Au sein de l'espèce *A. carbonarius* une seule variété a été proposée, il s'agit de *A. carbonarius* var. *incidus* [151].

*A. carbonarius* est un contaminant majeur de certaines denrées tropicales et subtropicales tels que le raisin et ses dérivés [155]. Dans cette filière, le risque de contamination en OTA commence sur le terrain. Quelques espèces d'*Aspergillus* noir sont décrites comme étant capables de produire de l'OTA, notamment l'agrégat *A. niger* et *A. carbonarius* [153]. Ces espèces sont déjà présentes à la vigne et ont la capacité de produire dans les baies une pourriture appelée pourriture d'*Aspergillus*. Parmi les espèces de ce groupe, *A. carbonarius* présente le potentiel ochratoxigénique le plus élevé [156].

Récemment, l'importance de ces espèces a complètement changé depuis certains d'entre eux, dans *A. carbonarius* particulier, est considéré comme la principale source d'OTA dans le raisin et le vin [145].

Dans le cas du café, la contamination en OTA se développe surtout durant les opérations post-récolte. L'*A. ochraceus*, *A. carbonarius* a été prouvé que ce sont les responsables de la production d'OTA dans le café [157].

Divers rapports mis en évidence que les membres du complexe d'espèces *A. Niger*, en collaboration avec *A. carbonarius* et *A. japonicus / aculeatus* sont souvent responsables de post-récolte décroissance de fruits frais (pommes, poires, pêches, agrumes, raisins, figues, fraises, tomates, melons, etc) et certains légumes (notamment les oignons, l'ail, et l'igname); en outre, il est également plus fréquente parmi les champignons isolés à partir de fruits secs, les haricots, les graines oléagineuses et des noix (arachides, noix de pécan, pistaches, noisettes, amandes, les noix etc) [158].

### 3.2.2. Le genre *Penicillium*

Ce genre contamine divers substrats organiques notamment les céréales, les arachides, les produits laitiers. C'est aussi un contaminant de laboratoire. Il a des caractéristiques proches que celles du genre *Aspergillus*, il est saprophyte et peut devenir parasite en présence d'humidité lors du stockage [146].

La majorité d'espèces du genre *Penicillium* sont capables de produire des mycotoxines : l'acide cyclopiazonique (*Penicillium chrysogenum*), l'acide pénicillique (*Penicillium cyclopium*) ; la patuline ou la clavacine (*Penicillium expansum*, *Penicillium griseofulvum*), la citrinine (*Penicillium expansum*), l'ochratoxine A (*Penicillium verrucosum*) [159].

Le genre *Penicillium* comprend près de 150 espèces, il est aussi largement présent dans le sol. Ce sont des micro-organismes simplement saprophytes considérés comme agents de contamination des denrées alimentaires ou utilisés comme agents de synthèse ou de fermentation et comme producteurs d'antibiotiques (Pénicilline, griséofulvine) [146].

#### 3.2.2.1. *Penicillium expansum*

*P. expansum* est nécrotrophe et présente une phase saprophytique à la surface des fruits avant de développer une structure infectieuse. Cette phase est possible grâce à la présence de nutriments libérés par les fruits ou se trouvant à leur surface [160].

*P. expansum* est l'agent responsable de la pourriture bleue qui est la maladie la plus répandue des pommes en post-récolte [160]. Ce champignon ne cause pas seulement des pourritures mais peut également produire une mycotoxine « la patuline » qui est dangereuse pour la santé humaine (Immunotoxique, neurotoxique, néfaste sur l'appareil gastro-intestinal) [161]. Cette mycotoxine peut réduire considérablement la valeur des fruits atteints et les rend inacceptables au commerce.

La patuline (ou clavacine) est produite principalement par *Penicillium expansum*, un contaminant très fréquent des pommes abîmées et stockées. Le jus de pomme et le cidre sont ses principaux vecteurs, mais les poires, cerises et abricots sont également cités. Depuis longtemps connue des vétérinaires pour sa neuro-toxicité chez l'animal (paralysie de l'arrière-train chez les ruminants, etc.), son pouvoir cancérigène

n'est pas entièrement avéré chez l'animal et encore moins chez l'Homme [162]. L'exposition des humains à la patuline par la consommation de produits infectés peut conduire à la toxicose grave, y compris mutagènes, tératogènes, hépatotoxiques, néphrotoxiques, des effets neurotoxiques et génotoxique; ses effets aigus comprennent des nausées, vomissements et d'autres traumatismes gastro qui accompagnent des dommages aux reins [163]. À des doses élevées de patuline a été retrouvé à exposer des propriétés immunosuppressives [164].

## CHAPITRE 4

### MATERIELS ET METHODES

#### 4.1. Expérimentation

La partie expérimentale a été réalisée au laboratoire de la Faculté des sciences de la nature et de la vie, Université Ziane Achour de Djelfa pendant la période allant de septembre 2010 à Aout 2011. La détermination de la composition chimique des huiles essentielles a été effectuée au Département des ressources naturelles et en génie minier de l'UPC « Université Polytechnique de Catalogne » en Espagne.

#### 4.2. Matériel végétal

Les plantes qui ont fait l'objet de notre étude sont l'*Artemisia herba alba* Asso connue par le nom Chih et *Artemisia campestris* L connue par le nom de Tggouft, elles ont été choisies sur la base de ses utilisations en médecine traditionnelle locale.

Ce sont les parties aériennes (feuilles, tiges) qui ont fait l'objet de notre étude.

L'*Artemisia herba alba* Asso et *Artemisia campestris* L sont cueillies à la fin du mois d'Avril 2011.

Un ramassage au hasard est effectué dans un endroit naturel « Ain el Bel » une région loin de la pollution et ce pour écarter toute possibilité de modification dans la composition chimique du matériel végétal (Figure 4.8, Figure 4.9).

Au laboratoire, les plantes fraîchement récoltées, sont lavées et séchées à l'ombre pendant 72 heures dans un endroit sec et aéré à l'abri de la chaleur intense, de la lumière directe et de l'humidité pour assurer son séchage en premier et en second lieu son entreposage (dans des boites bien fermées) en vue de l'éventuelle extraction de son essence.



**Figure 4.8:** Vue d'ensemble d'un pied d'*Artemisia campestris* L.



**Figure 4.9:** Vue d'ensemble d'un pied d'*Artemisia herba alba* Asso.

#### 4.3. Microorganismes utilisés

Les souches utilisées dans notre étude ont été choisies pour leurs fréquences élevées à contaminer les denrées alimentaires et pour leur pathogénicité [165][166]. Les tests sont réalisés sur trois bactéries (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*) et trois champignons (*Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium expansum*) provenant du Laboratoire de microbiologie d'ENS Kouba-Alger- (Tableau 4.2). Ces souches ont été reçues dans des tubes stériles contenant 10ml de gélose de conservation puis conservées à une température de 4°C.

**Tableau 4.2** : Liste des souches microbiennes testées

Nom de la souche	Code
<b>Bactéries</b>	
<b>Bacillus subtilis</b>	ATCC 6633
<b>Escherichia coli</b>	ATCC 10536
<b>Micrococcus luteus</b>	ATCC 9314
<b>Champignons</b>	
<b>Aspergillus carbonarius</b>	M333
<b>Aspergillus flavus</b>	NRRL 3251
<b>Penicillium expansum</b>	NRRL 1829

#### 4.4. Les milieux de culture

Suivant les méthodes employés dans l'essai et selon les souches, nous avons utilisé comme milieux de culture les suivants :

- Gélose Nutritive, Bouillon et Gélose Mueller Hinton pour les bactéries,
- Gélose de dextrose de Sabouraud(GDS), appelée communément Sabouraud Merck pour les champignons,

Les milieux de culture proviennent du commerce (Arige).

#### 4.5. Procédé d'extraction

Les huiles essentielles sont extraites par la méthode d'hydrodistillation. 50 g de matériel végétal sec (partie aérienne de la plante) sont introduits dans un ballon de 1 litres imprégnés d'eau distillée, l'ensemble est porté à l'ébullition pendant 2 à 3 heures ; la vapeur d'eau produite entraîne les constituants volatils, qui après refroidissement et

condensation dans le réfrigérant, sont recueillis dans le récipient de recette .Le distillât recueilli subit un relargage par l'ajout de quelques cristaux de chlorure de sodium (le Na Cl ayant plus d'affinité à l'eau que l'essence incite celle-ci à flotter, puisque les essences généralement sont moins denses que l'eau).

Le distillât est ensuite transvasé dans une ampoule à décanter où l'huile essentielle est séparée de l'eau par une extraction liquide-liquide au moyen de l'éther (plus spécifiquement appelé Diéthyl ether, de formule brute  $(C_2H_5)_2O$ , on agite vivement l'ampoule à décanter en tenant bien le bouchon, il se produit alors une surpression, on ouvre le robinet pour la dégazer, on place l'ampoule sur un support puis on laisse décanter après quoi on récupère la phase organique.

Pour éliminer toute trace d'eau dans la phase organique on lui ajoute et on laisse agir pendant 15 mn du sulfate de magnésium anhydre ( $Mg SO_4 7H_2O$ ).

Après filtration sur papier filtre la phase organique exempte d'eau est constituée de l'huile essentielle plus le solvant, ce dernier est éliminé grâce à une distillation dans un évaporateur rotatif.

Les H.Es extraites sont conservées à une température voisine de  $4 \pm 1^\circ C$ , dans des flacons en verre opaque, fermés hermétiquement pour les préserver de l'air, de la lumière et des variations de température qui sont des principaux agents de dégradation. Une huile altérée perd son activité biologique.

#### 4.6. Calcul du rendement

Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport de la masse de l'huile essentielle extraite et la masse de la matière végétale sèche. Le rendement est exprimé en pourcentage (%) et calculé par la formule suivante [229]:

$$R (\%) = (M_{h,e} / M_{m.v}) \times 100$$

R = rendement en huile essentielle en %.

M<sub>h,e</sub> = Masse de l'huile essentielle en gramme.

M<sub>m.v</sub> = Masse de la matière végétale en gramme.



#### 4.7. Analyse de la composition chimique des H.Es par CG/SM

Nos échantillons d'H.E ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM), Cette technique est très utilisée dans l'analyse qualitative et quantitative des H.Es . L'analyse de la composition chimique des H.Es a été faite au niveau de l'Université Polytechnique de Catalogne (Espagne).

L'analyse des huiles essentielles ont été faites avec l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC / MS) THERMO ELECTRON Chambre. Le modèle de la chromatographie en phase gazeuse est FOCUS et le spectromètre de masse est un DSQ II. Les échantillons ont été dilués 1000 fois afin d'être analysés. 1 ml de l'échantillon dilué est injecté dans le chromatographe en phase avec un rapport de split de 100. L'ionisation des différentes composantes se fait par impact électronique. La température de la source d'ions est de 220 ° C. L'acquisition des données a été réalisée avec le mode FULL SCAN ( $m/z = 45$  à 350) et les données ont été traitées avec l'aide de logiciels XCALIBUR.

La séparation des différents composants d'huiles essentielles a été réalisée avec une colonne DB-5 ms, 30 m de long et 0,22 mm de diamètre. Les conditions chromatographiques ont été: injecteur de température et de transfert de ligne: 250 ° C. Programmation de la température du four: température initiale de 40 ° C pendant 4 minutes, suivie d'une montée en température de 10 ° C / min jusqu'à 280 ° C. Cette température finale est maintenue pendant 5 minutes. L'identification des composants a été effectué avec l'aide de la base de données NIST / EPA / Base de données des spectres de masse et les NIH le travail de collecte des spectres de masse des composants de différentes huiles essentielles, l'identification des indispensables composants de l'huile par chromatographie gazeuse / spectrométrie de mass. L'identification a été considérée comme les profils des spectres de masse des composants tels que les taux de rétention de ces derniers.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de la superficie totale des pics correspondants. Le signal de chaque pic est obtenu sur la base courant ionique totale (CIT).

#### 4.8. Tests microbiologiques

##### 4.8.1. Préparation de pré-culture

Les tests antimicrobiens doivent être réalisés à partir des cultures jeunes de (18 à 24 heures) en phase de croissance exponentielle. La réactivation des souches

est effectuée par ensemencement de l'espèce microbienne dans un milieu liquide. Les germes utilisés ont été cultivés sur gélose nutritive, les boîtes ainsi ensemencées sont incubées à 37°C pendant 18 heures pour les bactéries et à 25°C pendant 48 heures pour les champignons.

#### 4.8.2. Essai antifongique

Le criblage est réalisé suivant la méthode de contact directe décrite par MISHRA et DUBEY (1994). Dans des tubes à essai contenant chacun 20ml du milieu de culture Sabouraud stérilisé à l'autoclave pendant 15min à 121°C et refroidi à 45°C, on ajoute aseptiquement 50µg d'huile essentielle. Après dispersion de l'huile essentielle dans le milieu de culture, le mélange est versé dans des boîtes de Pétri de 9cm de diamètre. Dans chaque boîte, un disque du mycélium de diamètre égale à 6mm prélevé dans des conditions stériles à été déposé au centre du milieu. Des témoins contenant le milieu de culture et le disque mycélien sans huile essentielle ont été réalisés en parallèle. Chaque essai est répété trois fois. Les boîtes de Pétri ont été placées à l'étuve à 28°C pendant 5 jours. Le diamètre de croissance mycélienne est mesuré et comparé à celui du témoin. Le pourcentage d'inhibition est déterminé par la formule suivante:

$$I(\%) = \frac{D - D_i}{D} * 100$$

**I(%)**: inhibition de la croissance fongique en pourcentage

**D**: diamètre de la croissance mycélienne dans un milieu sans huile essentielle (témoin)

**Di**: diamètre de la croissance mycélienne en présence d'huile essentielle (essai)

#### 4.8.3. Essai antibactérien

##### 4.8.3.1. Etude de l'activité antibactérienne

Pour évaluer l'activité antimicrobienne des H.Es, nous avons adopté la méthode de diffusion sur milieu gélosé appelée aromagramme [167].(BENJELELI et al., 1986)

Le principe de la méthode repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu solide dans une boîte de Pétri, avec création d'un gradient de concentration après un certain temps de contact entre le produit et le microorganisme cible. L'effet du produit

antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition. La souche sera qualifiée de sensible, très sensible, extrêmement sensible ou résistante .

- **Repiquage des espèces bactériennes** : les différentes espèces bactériennes ont été repiquées par la méthode des stries, puis incubées à 37 °C afin d'obtenir des colonies isolées qui vont servir à la préparation de l'inoculum.
- **Préparation de l'inoculum** : A partir des cultures jeunes sur (GN). On prélève 3 à 5 colonies bien isolées et identiques dans 5 ml d'eau physiologique stérile, on agite au vortex pendant quelques secondes. La standardisation de la suspension à  $10^6$  UFC/ml, est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde de 620 nm. Selon Mac Farland [168], on admet une DO comprise entre 0,08 et 0,1 correspond a une concentration de  $10^7$  à  $10^8$  germes/ml ; la suspension d'inoculum est diluée à 1:10 dans de l'eau distillée stérile pour avoir une concentration de  $10^6$  germes/ml.
- **Préparation des disques** : des disques de papier buvard absorbant de 6 mm de diamètre, stériles sont chargés de l'extrait naturel à tester « huile », des disques imprégnés de méthanol sont également utilisés qui vont servir de témoin négatif.
- **Préparation des milieux de culture** : la gélose de Muller Hinton stérile prête à l'usage a été coulée dans des boites de Pétrie stériles de 90 mm de diamètre. L'épaisseur de la gélose est de 2 mm répartie uniformément dans les boites. Ces dernières doivent être séchées 30 min à une température ambiante du laboratoire avant leur emploi.
- **Ensemencement** : des boites de Pétrie stériles préalablement coulées, sont ensemencées par étalage à l'aide d'un râteau stérile, l'ensemencement s'effectue de telle sorte à assurer une distribution homogène des bactéries.
- A l'aide d'une pince stérile, les disques de papier filtre contenant l'huile sont déposés à la surface de la gélose inoculée au préalable.

➤ **Lecture** : La lecture s'effectue après 24 heures d'incubation par la mesure du diamètre de l'halo d'inhibition (le diamètre du disque inclu), La lecture se fait à l'aide d'un pied de coulisse ou une règle en (mm). Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisé par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis des H.Es [169].

- Non sensible (-) ou résistante : diamètre < 8mm.
- Sensible (+) : diamètre compris entre 9 à 14 mm.
- Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 à 19 mm.
- Extrêmement sensible (+++) : diamètre > 20 mm.

#### 4.8.3.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et nature de l'activité antibactérienne des huiles essentielles:

- **Méthode de dilutions en milieu solide [170][65]**

L'utilisation des H.Es dans les produits alimentaires est souvent limitée par effets indésirables (odeur forte, changement de goût) qu'elles peuvent engendrer dans l'aliment. Pour cette raison, il est nécessaire de déterminer la CMI (la concentration minimale inhibitrice) de l'H.E capable d'inhiber la croissance de bactéries sans altérer les caractéristiques organoleptiques de l'aliment. Selon l'effet recherché et les bactéries ciblées, la concentration ne sera pas la même [86].

D'après SKANDAMIS & NYCHAS [165], la CMI est définie comme étant la plus faible concentration en H.E capable d'induire une réduction de la croissance microbienne de 90% ; donc ne laisse survivre que 10% de la population.

Nous avons déterminé la CMI pour les H.Es d'*A. herba alba* et d'*A.campestris* qui ont présenté une activité antibactérienne importante vis-à-vis de *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*. Nous avons éliminé les mycéliums (*Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium expansum*) qui n'ont pas été sensibles aux H.Es d'*Artemisia*.

La difficulté rencontrée pour l'utilisation des H.Es dans des milieux de culture à base d'eau, c'est leur faible solubilité. Plusieurs substances ont été utilisées pour cette fin: éthanol; méthanol, Tween-20 ,DMSO [65]. Nous avons effectué nos tests avec l'émulsifiant « éthanol ».

➤ Préparation de la gamme de dilutions

Pour la détermination de la CMI la méthode utilisée est celle de la dilution en milieu gélosé. Des dilutions de demi en demi ont été effectuées dans une gamme de concentration de 500µl/ml à 0,97µl/ml de l'HE à tester (Tableau 4.3 ). L'HE est d'abord diluée dans l'éthanol selon les proportions 1/9 (Emulsifiant/H.E).

**Tableau 4.3** : Valeurs des dilutions utilisées pour déterminer les CMI.

Rapport de dilution	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024
%	<b>50</b>	<b>25</b>	<b>12.5</b>	<b>6.25</b>	<b>3.12</b>	<b>1.5</b>	<b>0.78</b>	<b>0.4</b>	<b>0.2</b>	<b>0.1</b>
µl HE/ml	<b>500</b>	<b>250</b>	<b>125</b>	<b>62.5</b>	<b>31.25</b>	<b>15.62</b>	<b>7.81</b>	<b>3.90</b>	<b>1.95</b>	<b>0.97</b>

➤ Ensemencement en milieu solide

Liquéfier le milieu GMH à 95°C dans un bain marie, couler aseptiquement à raison de 15 ml de gélose par boîte de Pétri et laisser solidifier sur la paillasse. Mélanger 1ml de chaque dilution d'HE à tester avec 3ml de gélose MH en surfusion, puis agiter manuellement les tubes. Transvaser chaque contenu des tubes dans les boîtes contenant la première couche de gélose. Après solidification du milieu, réaliser un ensemencement en surface de 1 ml de suspension bactérienne (cellules jeunes de 18 à 20 heures, en phase exponentielle) de concentration de  $10^6$  UFC/ml. L'ensemble est incubé à 37°C pendant 24 heures.

La lecture des résultats se fait visuellement par l'observation de la croissance ou de l'inhibition de la croissance du microorganisme antimicrobien test par rapport à la croissance sur une boîte témoin sans extrait. La CMI est définie comme étant la plus petite concentration du produit pour laquelle aucune croissance n'est visible à l'œil nu.

Pour les boîtes qui ne présentent pas de croissance, le disque de bactérie est transféré sur un milieu gélosé M-H neuf pour confirmer s'il s'agit d'un effet

bactériostatique ou bactéricide sur les bactéries. La CMB a été définie comme étant la plus faible concentration de l'agent pour lesquelles il y a absence totale de colonies en comparaison avec les témoins après 24H de culture à 37 C.

## CHAPITRE 5

### RESULTATS ET DISCUSSION

#### 5.1. Rendement en HEs

Les huiles essentielles ont été extraites par hydrodistillation des matériaux végétaux secs. Les rendements en huiles essentielles ont été calculés en fonction de la matière végétale sèche de la partie aérienne de la plante. Les échantillons d'*A. herba alba* ont fourni un taux d'environ 0,7 % qui est plus élevé que celui obtenu à partir d'*A. campestris*, qui est de 0,3 %.

##### 5.1.1. Rendement en HE d'*A. campestris* L

La teneur en huile essentielle des parties aériennes d'*Artémisia campestris* obtenue est plus élevée que celle rapportée pour l'*A. campestris* de Serbie qui est de l'ordre de 0.2% [37] mais il est plus faible que celui obtenu à partir des échantillons prélevés de Tunisie et de la France et qui est respectivement de 1.2 et 1.4 % (ml/100 g) [42][39].

Le rendement en huile essentielle varie beaucoup avec la plante utilisé, le matériel employé pour l'extraction et la méthode d'extraction, aussi bien l'origine de la plante.

##### 5.1.2. Rendement en HE d'*A. herba alba* Asso

Le rendement en huile essentielle d'*Artemisia herba alba* de Djelfa qui est de 0.7% peut être considéré comme moyenne : la teneur en HE de l'armoise blanche de sud de la Tunisie est comprise entre 0.68% à 1.93% [29]. Alors que le rendement en HE d'*A. herba alba* de l'Espagne varié de 0.41 % à 2.3% [17].

En effet, la teneur en HE obtenue pour l'armoise blanche de Djelfa est plus élevée que celle rapportée pour l'*Artemisia arborescens* et l'*Artemisia judaica* qui est respectivement de 0,3 et 0,4 % (ml/100 g) [171].

Cependant, la teneur obtenue en HE pour les deux armoises (*A. campestris* L et *A. herba alba* Asso) reste relativement faible par rapport à celle d'autres espèces d'*Artemisia*, telles que l'*Artemisia haussknechtii* (2,1 % [ml/100 g]) [172] et l'*Artemisia sieberi* (1,7 % [ml/100g]) [173].

Cette différence en rendement entre les armoises peut être expliquée selon KELEN & TEPE [174] par le choix de la période de récolte car elle est primordiale en termes de rendement et qualité de l'H.E.

Le climat, la zone géographique, la génétique de la plante l'organe de la plante utilisé, le degré de fraîcheur, la période de séchage, la méthode d'extraction employée, etc. ce sont des facteurs entre autres qui peuvent avoir aussi un impact direct sur les rendements en H.Es [175].

Pour optimiser le rendement en H.E, plusieurs études ont été réalisées sur des parties végétales fraîches et, la concentration en eau du matériel végétal a été prise comme facteur de variation [176].

## 5.2. Analyse de la composition chimique

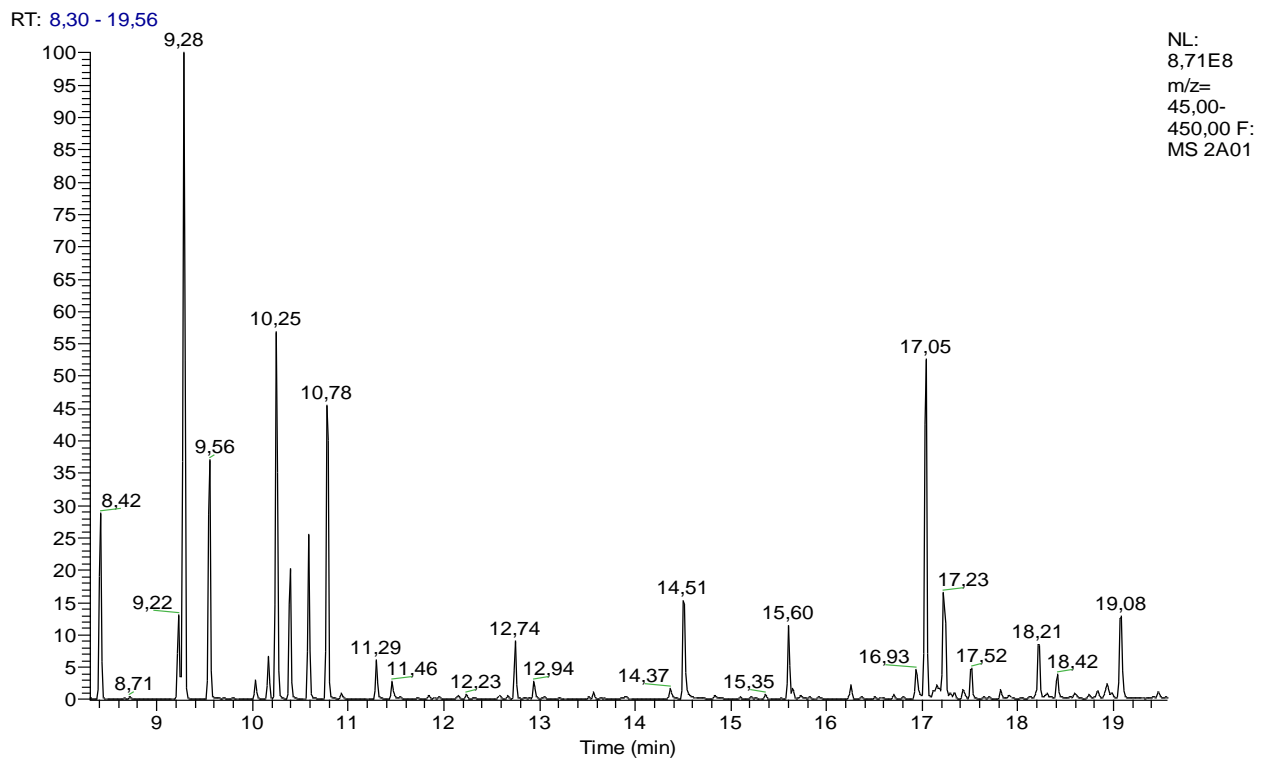
Dans la recherche de méthodes alternatives de lutte antibactérienne, le règne végétal offre beaucoup de possibilités. De nombreuses études se développent actuellement pour isoler et identifier des composés de plantes qui ont une activité antibactérienne, antioxydante, antifongique et insecticide [177][100][178][179].

La composition chimique de l'huile essentielle d'*A.herba alba* est complètement distincte de celle d'*A.campestris*. En effet, le davanone composé principal de l'essence d'*A.herba alba* est présent en faible quantité dans l'huile d'*A.campestris*. D'un autre côté, le  $\beta$ -pinène, composé dominant d'*A.campestris*, est sans importance dans l'huile d'*A.herba alba*. Aussi, le limonène et  $\gamma$ -terpinène, l' $\alpha$ -pinène, constituant majoritaire d'*A.campestris*, est absent dans l'huile d'*A.herba alba*. Les variations rencontrées dans la composition chimique des huiles essentielles, du point de vue qualitatif et quantitatif, peuvent être dues à certains facteurs écologiques, à la partie de la plante utilisée, à l'âge de la plante et à la période du cycle végétatif, ou même à des facteurs génétiques [76].



### 5.2. 1. Analyse de la composition chimique d'*Artemisia campestris* L

Les résultats de l'analyse de la composition de l'HE d'*A.campestris* L obtenus par comparaison des données de la masse des spectres et des temps de rétention. Sont représentés dans la figure 5.10.



**Figure 5.10:** Profil chromatographique de l'HE d'*A. campestris* L analysée par CG/SM.

**Tableau 5.4** : Principaux composés chimiques (%) de L'H.E d'A. *campestris* L analysée par la CG/SM.

<b>RT</b>	<b>Composant</b>	<b>Pourcentage</b>
<b>8,41</b>	$\alpha$ -Pinene	6,02
<b>9,22</b>	Sabinene	2,86
<b>9,28</b>	$\beta$ -Pinene	20,75
<b>9,55</b>	Mircene	7,90
<b>10,25</b>	Limonene	10,46
<b>10,40</b>	(Z)- $\beta$ -Ocimene	4,12
<b>10,58</b>	(E)- $\beta$ -Ocimene	4,34
<b>10,93</b>	cis-Sabinene Hydrate	1,05
<b>10,78</b>	$\gamma$ -Terpinene	10,18
<b>11,29</b>	trans-Sabinene Hydrate	1,12
<b>12,74</b>	4-Terpineol	1,66
<b>12,94</b>	$\alpha$ -Terpineol	0,55
<b>14,37</b>	Thymol	0,12
<b>14,51</b>	Carvacrol	4,00
<b>17,04</b>	Germacrene D	9,53
<b>17,23</b>	$\beta$ -Selinene	3,29
<b>18,21</b>	Davanone	1,33
<b>19,08</b>	$\beta$ -Eudesmol	3,30
	Autre minorité	7,41

Dix-huit composés, ce qui représente plus de 92% de l'huile, ont été identifiés (tableau 5.4). Les principaux composés sont  $\beta$ -pinène (20,75%), le limonène (10,46%) et  $\gamma$ -terpinène (10,18%), suivie par germacrène D (9,53%), myrcène (7,90%),  $\alpha$ -pinène (6,02%), (E)- $\beta$ -ocimène (4,34%), (Z)- $\beta$ -ocimène (4,12%), carvacrol (4,00%),  $\beta$ -eudesmol (3,3%) et le  $\beta$ -selinene (3,29%), sabinene (2,86%).

Les hydrocarbures monoterpènes constituent la majeure partie de l'huile (75,13%) tandis que les hydrocarbures sesquiterpéniques ne représentent que 17,45%.

Les essences d'A.campestris originaires de la Tunisie présentent les mêmes composés majoritaires  $\beta$ -pinène (34,2%) et le limonène (8,2%), suivie par germacrène D

(7,3%),  $\gamma$ -terpinène (6,1%),  $\beta$ -myrcène (6,0%),  $\alpha$ -pinène (5,3%), (Z)- $\beta$ -ocimène (4,6%), (E)- $\beta$ -ocimène (4,3%),  $\beta$ -eudesmol (2,8%) et le p-cymène (2,3%). Mais on note que l'huile d'*A.campestris* de Djelfa est relativement plus concentrée presque pour tous les constituants mais moins riche en  $\beta$ -pinène (34,2-20,75 %).

Il existe aussi une différence considérable dans la composition chimique de l'huile essentielle d'*A. campestris* de Djelfa et celle de Boussaada étudiée par BELHATTAB et al [180]. L'HE d'*A. campestris* de Boussaada contient comme principaux constituants  $\alpha$ -terpinène (18,8%) et  $\alpha$ -pinène (18,4%), alors il n'y avait que 10,18% de  $\gamma$ -terpinène et 6,02% de  $\alpha$ -pinène dans notre huile. Le camphrier (9,2%), camphène (7,7%) et le bornéol ont été trouvés dans l'huile de Boussaada alors qu'ils n'ont pas été détectés dans l'essence d'*A.campestris* provenant de Djelfa.

Ce qui confirme que la région d'origine influence beaucoup d'une manière quantitative et qualitative la sécrétion en l'huile d'une plante aromatique. Donc on peut suggérer qu'il existe différents chémotypes d'HE d'*A.campestris* en Algérie.

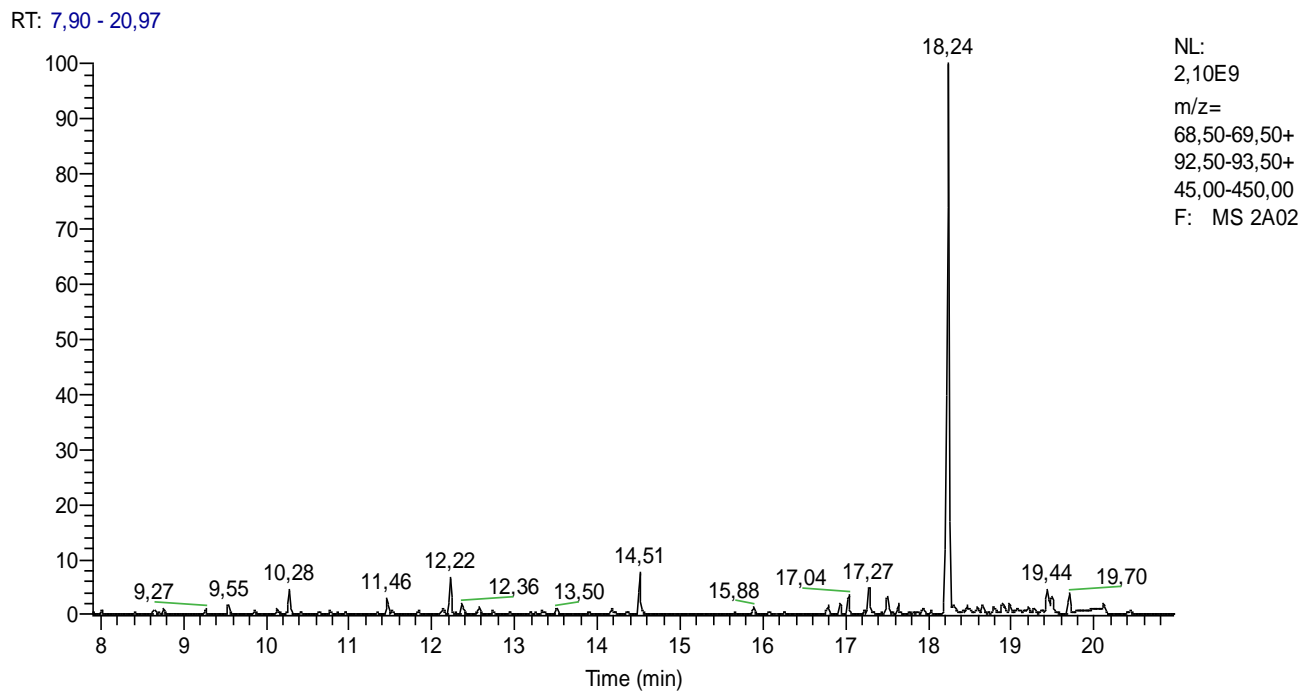
L'huile récupérée à partir de feuilles d'*A. campestris* de la Serbie contient des sesquiterpènes alcools:spathulenol (9,2%) et 4-hydroxy-9-épi-[beta]-caryophyllène (3,0%) [37], qu'ils n'ont pas été détectés dans l'HE de l'*A.campestris* de Djelfa. Alors que cette dernière est plus concentrée en matière des hydrocarbures monoterpènes. Aussi le  $\gamma$ -terpinène qu'il est absent à l'HE de Serbie [37], il est considérée dans notre cas parmi les composants majoritaires.

Par ailleurs, Il existe une différence remarquable entre la composition de l'huile d'*A. campestris* analysée et de celle originaire de la Turquie. Les principaux composants de ce dernière (thujol (15%), géraniol (13%), 1,8-cinéole (8%) et la thuyone (4%)) [181], sont absent dans HE d'*A.campestris* de Djelfa. Alors que celle provenant du turque est riche en [alpha] - et [beta]-pinène comme notre huile d'*A.campestris* étudiée.

Sur la base de nos résultats et les résultats des autres auteurs, on peut conclure que la composition de l'huile d'*Artemisia campestris* montre une importante variabilité intraspécifique.

### 5.2. 2. Analyse de la composition chimique d'*Artemisia herba alba* Asso

Les résultats de l'identification qualitative et quantitative des composés chimiques par CG/SM de l'H.E d'*Artemisia herba alba* sont présentés dans la figure 5.11 et le tableau 5.5.



**Figure 5.11:** Profil chromatographique de L'H.E d' *A. herba alba* analysée par CG/SM.

**Tableau 5.5:** Principaux composés chimiques (%) de L'H.E d'A. *herba alba* Asso analysée par la CG/SM.

<b>RT</b>	<b>Composant</b>	<b>Pourcentage</b>
<b>9,27</b>	$\beta$ -Pinene	0,46
<b>9,54</b>	Myrcene	0,84
<b>10,28</b>	Eucalyptol	2,24
<b>11,46</b>	Linalool	1,61
<b>12,22</b>	Camphor	3,48
<b>14,51</b>	Carvacrol	4,88
<b>16,79</b>	Davanone isomer + impurity	0,81
<b>17,03</b>	Davana ether + Germacrene D	2,20
<b>17,28</b>	Davana ether	3,62
<b>17,51</b>	Davana ether + impurity	1,80
<b>18,24</b>	Davanone	62,20
<b>19,43</b>	Davanone isomer	2,50
<b>19,49</b>	Unidentified	2,18
<b>19,70</b>	Unidentified	1,95
<b>20,12</b>	Davanone isomer + impurity	0,62
	Autre minorité	8,62

Au cours des dernières décennies, l'huile d'*Artemisia herba-alba*; appelée huile scheih [182] a été étudié par plusieurs auteurs.

L'analyses chromatographique de l' HE de l'*Artemisia herba-alba* de la région de Djelfa a révélé la présence de 13 composés. Ces constituants représentent environ 87,26 % de la totalité de l'HE (tableau 5.5). L'huile essentielle d'*A. herba alba* étudiée est largement dominée par les sesquiterpènes (73,75 %). Nous constatons également la présence de quelques composés monoterpéniques :  $\beta$ -pinene (0,46 %), linalool (1,61 %), Mycènes (0.84 %) dans l' HE d'armoise blanche de Djelfa.

L'huile essentielle d'*A. herba alba* du Djelfa est composée principalement de davanone (62,20%) sa concentration atteint une valeur très élevée, jamais mentionnée auparavant, qui est supérieur à 62%. Cette huile peut être considérée comme l'huile chémotype davanone.

Le davanone, et ses dérivés, ont également été identifiés en Israël [26], mais les plus hauts niveaux ont été observés au Maroc, conduisant à la définition de quatre chémotypes de davanone [183]. Aussi, l'étude de l'huile d'*Artemisia herba alba* provenant de l'Espagne a montré que le davanone était le principal composant [184][17].

Le davanone a été trouvé également dans l'HE d'*A. douglasiana*, d'*A. inculta*, d'*A. judaica*, d'*A. maritimes* subsp. *maritimes* et d'*A. persica* [185][186]. Par ailleurs, le davanone est obtenue dans l'un des chémotypes du *Tanacetum vulgare* [185][187].

L'essence d'*A. herba alba* de Djelfa contient aussi d'autres constituants mais à des teneurs relativement faibles: carvacrol (4,88%), davana éthère (3,62%), camphore (3,48%), eucalyptol (2,24%).

Le camphre, est peu présent dans notre HE (3,48 %). Par contre, il est très importante dans l'HE d'armoise blanche de M'Sila (15,80 %) ,Bou Saada, Batna, Sidi Aïssa [113]. Des études antérieures ont montré que le camphre est le principal composé de l'armoise blanche d'Espagne et d'Israël avec un pourcentage qui se situe entre 15 et 68 % [26][29].

La présence de davana éther (3,62 %) est à noter. Ce composant est présents uniquement dans l'HE provenant du sud de la Tunisie et de l'Espagne à quantité variable 0,2 à 4,56 % .

L'eucalyptol qui atteint une valeur de 2,24 % dans notre HE d'*A. herba alba*, il est identifié comme le constituant majoritaire dans l'HE d'armoise blanche provenant du sud de l'Espagne (41 % au maximum) [17]. Il est l'un des principaux composés dans les HE provenant d'Ichemoul en Algérie [188], du sud de la Tunisie et de Matmata (Tunisie) [30][29] (3 à 20 %). Il n'est pas présent dans celle provenant de M'Sila [12] et de Jordanie [189]. Ce composé est surtout présent dans les HE à activité antispasmodique.

L'huile essentielle d'*A. herba alba* présente un polymorphisme chimique très important. En effet, la composition chimique de l'HE de l'armoise blanche de Djelfa est largement différente de celle de la région de M'sila qui est dominée par le camphre (19,4 %), le trans-pinocarveol (16,9 %), la chrysanthénone (15,8 %) et la  $\beta$ -thujone (15 %) [12]. Elle est aussi différente de l'HE d'*A. herba alba* de Biskra qui contient en majorité de l'acétate de cis-chrysanthényle (25,12 %), du 2E,3Z-2-éthyliden-6-méthyl-3,5-heptadiène (8,39 %), de l' $\alpha$ -thujone (7,85 %), de l'acétate de myrtényle (7,39 %), de la verbénone (7,19 %), de la chrysanthénone (4,98 %) [190]. C'est le cas aussi pour l'HE d'*A. herba alba* de la Tunisie, pour lequel AKROUT et al. [30] ont montré que l'huile essentielle de cette espèce originaire de Matmata est dominée par l' $\alpha$ -thujone (43,85 %), le trans-acétate de sabinyle (17,46 %) et la  $\beta$ -thujone (10,10 %) accompagné du 1,8-cinéole (3,30 %), du chrysanthénone (2,32 %) et de l'acétate de chrysanthényle (3,93 %).

Quant à l'HE de l'armoise blanche de la Jordanie, elle présente l' $\alpha$ - et la  $\beta$ -thujones comme principaux composés (16,2 et 8,5 % respectivement), suivis de l'alcool de santoline (13,0 %), l'Artemisia cétone (12,4 %), l'acétate de trans-sabinyle (5,4 %), le D-germacrène (4,6 %), l' $\alpha$ -eudesmol (4,2 %) et l'acétate de caryophyllène (5,7 %) [189].

Tout cela montre que la composition chimique de l'HE de l'armoise blanche est très variable selon la période et le lieu de la récolte. La différence des teneurs de ces composés peut être attribuée à la variation des paramètres environnementaux (stade phénologique de la plante, stress biotique et abiotique, etc.) qui oriente la biosynthèse vers la formation préférentielle de produits précis.

En conclusion, cette étude montre que l'HE d'*A. herba-alba* de Djelfa « Ain Bel » ne contient pas d'acétate chrysanthényle et acétate de bornyle, qui sont trouvés en tant que composants principaux dans les huiles d'*A. herba alba* provenant de différentes régions d'Algérie [191][192], mais il contient le davanone qui est le principal composant comme d'autres huiles d'*A. herba alba* originaire du Maroc [183], d'Espagne [17] et Israël [26]. Cette variabilité est également observée dans d'autres espèces comme *A. thuscula* (syn. *A. canariensis*), originaire de l'archipel des Canaries, où plusieurs chémotypes comme un davanone-type et un camphor type ont été identifiées [193].

### 5.3. Activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*A. herba alba* et d'*A.campestris*

L'étude qualitative de l'activité antimicrobienne des HE d'*A.herba alba* et d'*A.campestris* été faite sur 3 bactéries et 3 moisissures provenant de la collection du laboratoire microbiologique de ENS de Kouba . L'évaluation a été faite par la méthode des aromagrammes. Le pouvoir antimicrobien de ces extraits est obtenu par la mesure des diamètres des zones d'inhibition (mm).

Les observations effectuées sur l'effet des H.E testées sur la croissance des souches bactériennes sont représentées dans les tableaux 5.6, 5.7, 5.8 et les Figures 5.18, 5.19.

**Tableau 5.6** : Diamètres des zones (mm) d'inhibitions (moyenne  $\pm$  écart type) des H.Es d'Artemisia.

	<i>A. herba alba</i> Asso	<i>A.campestris</i> L
<b>E. coli</b>	<b>12<math>\pm</math>0.1</b>	<b>17<math>\pm</math>0.5</b>
<b>M. luteus</b>	<b>18<math>\pm</math>0.6</b>	<b>22<math>\pm</math>0.1</b>
<b>B. subtilis</b>	<b>16<math>\pm</math>1.5</b>	<b>19<math>\pm</math>0.3</b>

Les HEs d'*A.herba alba* Asso et d'*A.campestris* L pures ont une forte activité sur toutes les souches bactériennes testées ( $D > 12$ mm) . Elle diminue la masse bactérienne de *Mocccoccus luteus* , de *Bacillus subtilis* , et d'*Escherichia coli* . Les diamètres d'inhibition varient de 12 mm à 22 mm. Le plus grand diamètre d'inhibition est obtenu avec *M.luteus* (22 mm) testé par l'HE d'*A.campestris* et le plus petit avec *Escherichia coli* (12 mm) testé par l'HE d'*A.heba alba*. Donc, les résultats obtenus montrent que les Gram(+) *M. luteus* et *B. subtilis* sont les plus sensibles quelle que soit l'huile. En effet *E. coli* Gram (-) représente la bactérie la plus résistante.

En comparant les données obtenues des différentes études, la plupart des auteurs font état d'une généralisation de l'activité antibactérienne d'une H.E, ou d'un extrait de plante contre les bactéries à Gram (+) et à Gram (-).

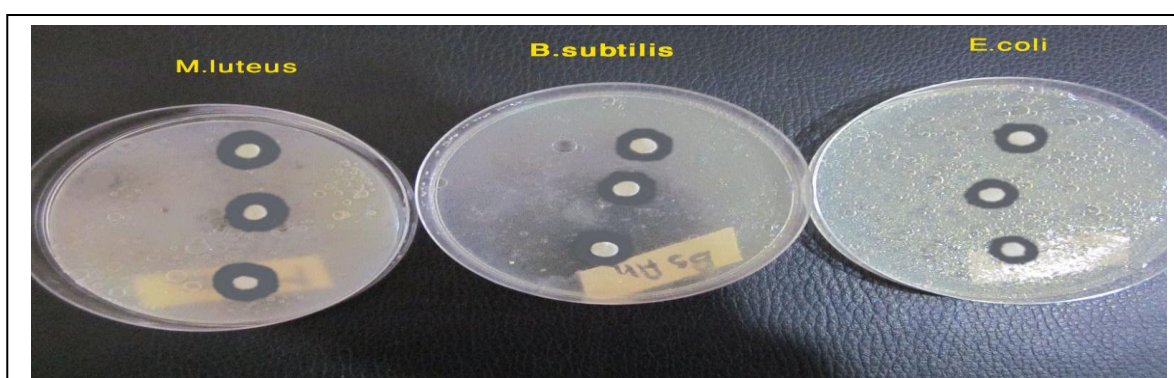
D'après KALEMBA & KUNICKA [194], la sensibilité d'un microorganisme aux H.Es dépend des propriétés de l'H.E et le microorganisme lui-même.



La majorité des huiles essentielles testées pour leurs propriétés antibactériennes ont montré un effet plus prononcé contre les bactéries Gram (+) [51]. La résistance des bactéries à Gram (-) aux huiles essentielles a été attribuée à leur membrane externe hydrophile qui peut bloquer la pénétration des composés hydrophobes dans la membrane de la cellule cible.

### 5.3.1. Activité antibactérienne de l'H.E d'A. *herba alba* Asso

La sensibilité des bactéries aux H.Es est déterminée selon le diamètre de l'halo d'inhibition par la méthode de diffusion sur gélose (Figures: 5.12, tableau 5.7).



**Figure 5.12:** Effet de l'H.E d'A. *Herba alba* sur: *E. coli*, *B. subtilis* et *M. luteus*.

L'activité antimicrobienne « in vitro » obtenue à l'aide de la méthode de diffusion sur gélose (aromatogramme) montrent que l'activité antibactérienne est en fonction de deux paramètres : la bactérie cible et la huile testée.

**Tableau 5.7:** Halos d'inhibition en (mm) (moyenne±écart type) provoqués par l'H.E d'*A. herba alba* Asso

	<i>E. coli</i>	<i>M. luteus</i>	<i>B. subtilis</i>
<b>Ø d'inhibition (mm)</b>	12±0.1	18±0.6	16±1.5
<b>Sensibilité</b>	sensible	Très sensible	Très sensible

L'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* a montré une activité élevée contre les *M. luteus* (18 mm) et *B. subtilis* (16 mm) et une activité modérée contre *E. coli* (12 mm).

DORMAN [67] a rapporté que l'activité antibactérienne des huiles essentielles est liée à leur composition, la structure et les groupes fonctionnels de leurs constituants et les interactions synergiques possibles entre les composants. Par ailleurs, il a été rapporté que les huiles essentielles riche en composants phénoliques possède des niveaux élevés d'activité antimicrobienne. Cependant, les composés majoritaires ne sont pas nécessairement responsables de l'activité totale, la participation des éléments les moins abondantes devrait également être considérée. Par conséquent, l'activité antibactérienne de l'HE d'*A. herba alba* peut être attribuée à la présence d'autres composants tels que le carvacrol, camphor, eucalyptol et linalol et également connue pour posséder une activité antibactérienne. Par ailleurs, l'activité antibactérienne des huiles essentielles peut être due à la présence d'une synergie entre les principaux composants et d'autres constituants des huiles menant à des degrés divers de l'activité antibactérienne. En outre, il a été rapporté que les souches d'*E. coli* qui ne sont pas sensibles au mélange de linalol-1,8-cinéole sont susceptibles d'être affectés par le linalol seule, ce qui suggère que possibles effets antagonistes et synergiques peuvent se produire selon le test de micro-organismes.

GHANMI et al. [27] ont étudié le pouvoir antibactérien de l'huile essentielle (HE) issue de l'armoise blanche (chrysothénone, camphre,  $\alpha$ -terpin-7-al et trans- $\beta$ -terpinéol) de la région de Guerçif (Maroc oriental) vis-à-vis *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* et *Staphylococcus aureus*. Ils ont démontré que les germes les plus sensibles sont *B. subtilis*, *M. luteus* ce qui concorde avec nos résultats.

AKROUT et al. [41], ont mené une étude pour évaluer in vitro l'activité antibactérienne et anti radiculaires de l'huile essentielle extraite de feuilles d'*Artemisia*

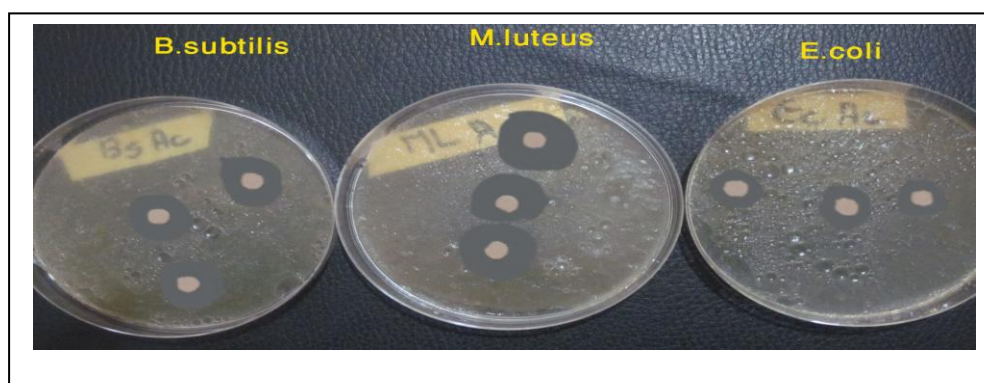
*herba alba* du sud de la Tunisie. L'HE de cette armoise dont les constituants majeurs étaient  $\beta$ -thuyone (30,0%) et  $\alpha$ -thuyone (25,7%) a montré une activité prononcée contre *Staphylococcus aureus* (30 mm), une activité élevée contre les *Serratia marcescens*, une activité modérée contre *Citrobacter freundii* et *Escherichia coli* (15 et 12 mm respectivement), et inactif contre *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas* et *Enterobacter aerogenus*. Ainsi dans notre étude nous avons enregistré le même diamètre d'inhibition (12 mm) pour la bactérie *E.coli* malgré la différence dans la composition chimique de la plante.

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* de l'ouest du Maroc a été mise en évidence par IMELOUANE et al. [195]. L'huile essentielle de cette plante qui est constituée principalement de camphre (43.07%), camphène (7.2%), 1,8-cineole (7.08%), filifolone (7.04%), borneol (4.88%), and bornyl acetate (3,79%) est testée contre des bactéries Gram (+) et Gram (-) *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et autres bactéries. *L. monocytogenes* est la plus sensible ( $70.00 \pm 0.11$  mm), *N.meningitidis* ( $60.10 \pm 0.17$  mm), *H.influezae* ( $34.00 \pm 0 - 49.83 \pm 0.76$  mm) et *K. pneumoniae* ( $16.00 \pm 0.1 - 40.00 \pm 0$ ). Mais une activité modérée est observée contre *E. coli* ( $12 \pm 0 - 17.23 \pm 0.25$  mm) alors que *P. aeruginosa* est considérée résistante.

Donc on peut conclure que l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* possède un large spectre d'activité antibactérienne.

### 5.3.2. Activité antibactérienne de l'H.E d'*A.campestris* L

La sensibilité des bactéries à l'H.E d'*A.campestris* L est déterminée selon le diamètre de l'halo d'inhibition par la méthode de diffusion sur gélose (Figures: 5.13, tableau 5.8).



**Figure 5.13:** Effet de l'H.E d'*A.campestris* sur: *E. coli*, *B. subtilis* et *M. luteus* ( $\emptyset$ =halo d'inhibition obtenu par la méthode de diffusion sur gélose)

L'huile d'*Artemisia campestris* a été jugé la plus active contre tous les souches bactériennes étudiés ; cet huile expose une activité antibactérienne prononcée contre *M. luteus* (22mm), et une activité élevée contre *B. subtilis* (19 mm) et *E. coli* (17 mm).

**Tableau 5.8:** Halos d'inhibition en (mm) (moyenne $\pm$ écart type) provoqués par l'H.E d'*A.campestris* L.

	<i>E. coli</i>	<i>M. luteus</i>	<i>B. subtilis</i>
<b><math>\emptyset</math> d'inhibition (mm)</b>	17 $\pm$ 0.5	22 $\pm$ 0.1	19 $\pm$ 0.3
<b>Sensibilité</b>	Très sensible	Extrêmement sensible	Très sensible

AKROUT et al. [41] ont étudié l'activité antibactérienne contre sept bactéries de l'huile essentielle d'*Artemisia campestris* de la Tunisie où les constituants majoritaires sont  $\beta$ -pinène (45,8%) et  $\alpha$ -pinène (12,5%). Cette huile est considérée efficace contre *Escherichia coli* qui a montré une sensibilité élevée (18 mm) ce qui concorde avec nos

résultat où nous avons enregistré un diamètre d'inhibition de 17mm. Dans la même étude ces auteurs rapportent que cette huile représentait une activité faible contre *Klebsiella pneumoniae* (10 mm), *Serratia marcescens* (5 mm) et *Citrobacter freundii* (10 mm) et inactif contre *Pseudomonas amnigenus* et *Enterobacter aerogunosa*.

Dans une autre étude menée sur les espèces d'*Artemisia* présentes à l'ouest de la Turquie, le pouvoir antibactérien de l'huile essentielle et l'extrait méthanolique d'*Artemisia campestris* est étudié contre *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium*. Il se trouve que l'huile essentielle d'*A.campestris* chémotype thujone est inactive contre *E. coli* (7mm).

L'activité antibactérienne de l'HE d'*A.campestris* peut être attribuée à sa richesse en  $\alpha$ -pinènes et  $\beta$ - pinène.

Les effets des  $\alpha$ -pinènes varient avec la composition globale des substances accompagnatrices, notamment les monoterpènes et les sesquiterpènes. Les  $\alpha$ -pinènes présentent une efficacité remarquable contre les bactéries Gram-positives et les levures, mais pas contre les bactéries Gram-négatives. Cependant, d'autres études démontrent l'effet antibactérien de ces terpènes à la fois sur des bactéries Gram-négatives et Gram-positives. Les  $\alpha$ - and  $\beta$ -pinènes agissent en provoquant des effets toxiques sur la structure et les fonctions des membranes cellulaires des levures et des bactéries pathogènes. D'après SIKKEMA et al.[196], l'action des terpènes sur ces membranes semble liée à leur caractère lipophile, provoquant une expansion membranaire, une augmentation de sa fluidité et l'inhibition des enzymes membranaires. Pour ANDREW et al [197] les  $\alpha$ - et les  $\beta$ -pinènes détruisent l'intégrité cellulaire des pathogènes, inhibant à la fois leur respiration et le processus de transport ionique, tout en modifiant la perméabilité cellulaire. HELANDER et al.[198] confirment les effets des terpènes sur la perméabilité de la membrane externe, en axant ses recherches sur les bactéries Gram-négatives. Elles présentent des résultats performants contre les bactéries pathogènes Gram-positives, dont *Clostridium perfringens*, *C. sporogenes*, *Staphylococcus aureus* et *S. epidermis*. Cependant, la capacité des  $\alpha$ -pinènes à détruire les bactéries *Escherichia coli* varient, d'une part selon la souche concernée (il existe des lignées pathogènes et des lignées non pathogènes), et d'autre part en fonction d'une possible synergie avec d'autres terpènes. Selon PICHETTE et al. [199] ces  $\alpha$ -

pinènes sont inefficaces alors que MAGWA et al.[200] et CHA et al. [201] démontrent le contraire.

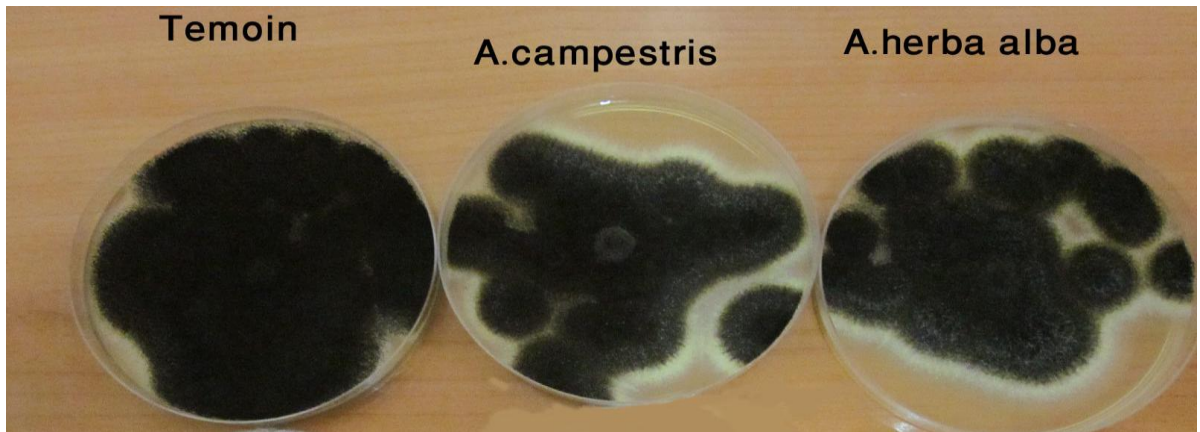
Les  $\beta$ -pinènes accompagnent généralement les  $\alpha$ -pinènes essentiellement dans les huiles. Les  $\beta$ -pinènes, utilisés seuls, présentent une activité antimicrobienne modérée, mais pas sur certaines souches, dont *Pseudomonas spp.* TAKIKAWA et al. [202] démontrent que les  $\beta$ -pinènes sont actifs sur des lignées pathogènes d'*Escherichia coli*, mais que leur action est nettement plus modérée sur des lignées non pathogènes.

Par ailleurs DORMAN & DEANS [67], ont révélé une importante activité de l'H.E de *Thymus vulgaris* contre *M. luteus* ( $\emptyset > 90$  mm), *E. coli* ( $\emptyset = 32,4$  mm) et *B. subtilis* ( $\emptyset = 23,4$  mm). Dans le même contexte MUJEEB UR RAHMAN et al. [237] ont rapporté que la sensibilité de *E. coli*, *M. luteus*, *B. subtilis* aux différentes concentrations d'H.E de *Ferula assafoetida* (50 $\mu$ g, 100 $\mu$ g, 150 $\mu$ g et 200 $\mu$ g); les halos d'inhibition obtenus étaient de l'ordre de: 10, 23, 34, et 42 mm pour *E. coli* et de 12, 16, 28 et 33 mm pour *B. subtilis* et de 17,23, 24, 30 mm pour *M. luteus*

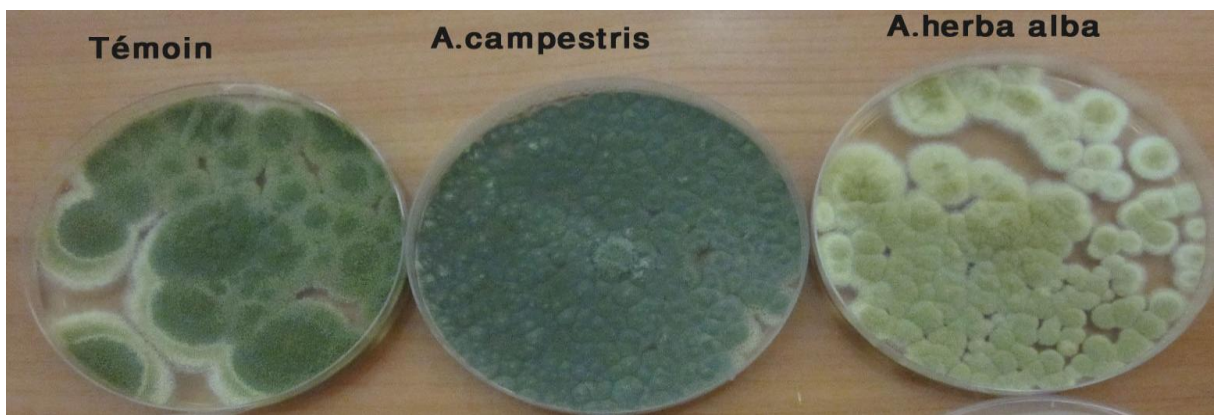
Par ailleurs DORMAN & DEANS [67], ont révélé une importante activité de thymol contre *M. luteus* ( $\emptyset = 53,1$  mm), *E. coli* ( $\emptyset = 34,3$  mm) et *B. subtilis* et une activité assez importante de carvacrol contre *M. luteus* ( $\emptyset = 26,6$  mm), *E. coli* ( $\emptyset = 29,2$  mm) et *B. subtilis* ( $\emptyset = 39,5$  mm)

#### 5.4. Activité antifongique de l'huile essentielle d'*A. herba alba* et d'*A.campestris* :

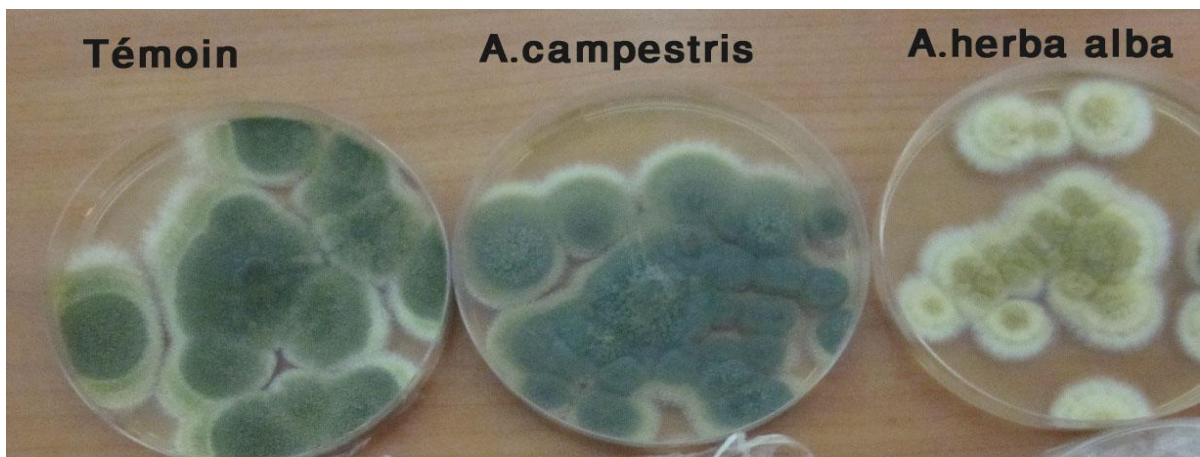
Les résultats de l'essai de l'activité antifongique de l'huile essentielle d'*A.herba alba* et d'*A.campestris* de la région de Djelfa figurent dans le tableau n° 5.9 et les figures n° 5.14, 5.15 et 5.16.



**Figure 5.14:** Effet de l'H.E d'*A. herba alba* Asso et H.E *A.campestris* L sur *Aspergillus carbonarius*



**Figure 5.15:** Effet de l'H.E d'*A. herba alba* Asso et H.E *A.campestris* L sur *Aspergillus flavus*



**Figure 5.16:** Effet de l'H.E d'*A. herba alba* Asso et H.E *A.campestris* L sur *Penicillium expansum*

**Tableau 5.9 :** Effet de l'huile essentielle d'*A.herba alba* et d'*A.campestris* sur le diamètre (mm) des colonies mycéliennes et sur le taux d'inhibition

	HE d' <i>A.herba alba</i>		<i>A.campestris</i>	
	Ø colonnie	% d'inhibition	Ø colonnie	% d'inhibition
<b>A. carbonarius</b>	<b>71</b>	<b>1.11%</b>	<b>74</b>	<b>17.78%</b>
<b>A. flavus</b>	<b>81</b>	<b>10%</b>	<b>90</b>	<b>0%</b>
<b>P.expansum</b>	<b>64</b>	<b>28.89%</b>	<b>68</b>	<b>24.44%</b>

Ces moisissures possèdent un potentiel de résistance très élevé contre l'action antifongique des H.Es d'Artemisia.

La faible activité antifongique de l'HE d'*Artemisia campestris* peut s'expliquer par son profil chimique pauvre en composés connus pour leur pouvoir antifongique comme certains alcools monoterpéniques [203][204] et les phénols [203] et riche en hydrocarbures terpénique (68%), notamment l' $\beta$ -pinène et le limonène. ce dernier, en particulier, ne présente aucun effet fongistique [205].

L'activité antifongique d'*Artemisia herba-alba* s'est avéré être associé à deux grands composés volatils: Carvone et pipéritone [121]. Ces derniers composés sont absent dans huile d'*A.herba alba* testée ce qui explique la faiblesse du taux d'inhibition dans tous les essais où il ne dépasse pas le 30%.

Lors d'une étude menant sur 25 plantes médicinales marocaines, y compris *A. herba-alba*, l'activité antifongique de l'huile essentielle d'*Artemisia herba-alba* contre *Penicillium digitatum*, *Phytophthora citrophthora*, *Geotrichum citri-aurantii* et *Potrytis cinerea* a été étudié. L'huile essentielle d'*A. herba-alba* n'a montré qu'une faible activité antifongique à 250 pg / ml de concentration [119].

Dans une autre étude , l'activité antifongique des huiles de l'armoise blanche est expliquée par leurs richesses en composés oxygénés (chrysothénone, camphre,  $\alpha$ -terpin-7-al et trans- $\beta$ -terpinéol). En effet, KORDALI et al. [206] ont démontré que les huiles d'*Artemisia santonicum* et *Artemisia spicigera* qui possèdent le taux le



plus élevé en composés oxygénés monoterpéniques sont plus actives que celles d'*Artemisia dracunculus* et *Artemisia absinthium*..

Alors que l'huile d'armoise blanche de Djelfa est très riche en sesquiterpènes (74 %) de la totalité des composants.

Les huiles d'*A. herba alba* et *A. campestris* n'ont exercé aucune activité fongicide contre tous les champignons testés. Ceci est dû à leurs profils chimiques pauvres respectivement en carvacrol et en thymol. Nos résultats corroborent ceux d'autres recherches qui ont démontré que le thymol et le carvacrol sont parmi les composés des huiles essentielles les plus actifs contre les champignons. En effet, KARMEN et al. [207] ont testé 22 composés purs issus d'huiles essentielles sur *C. versicolor* et *C. puteana* et ils ont montré que le thymol et le carvacrol sont les plus actifs contre ces deux champignons. Beaucoup de travaux ont souligné l'efficacité antifongique des phénols terpéniques et plus particulièrement celle du thymol et/ou du carvacrol [208][209]. Ces deux molécules possèdent un très large spectre d'activité antimicrobienne et ils sont naturellement présents dans les essences de la plupart des espèces de thym et d'origan [208][205][210].

#### 5.5. Concentrations minimales inhibitrices (CMI)

Les résultats des CMI des H.E testées sont représentés dans les tableaux 5.10, 5.11.

**Tableau 5.10** : Résultats de l'activité antimicrobienne CMI des HE d'*Artemisia herba-alba* Asso et d'*Artemisia campestris* L

Concentration %	50%		25%		12.5%		6.25%		3.12%		1.5%		0.78%		0.4%		0.2%		0.1%	
	Ac	Ah	Ac	Ah	Ac	Ah	Ac	Ah	Ac	Ah	Ac	Ah	Ac	Ah	Ac	Ah	Ac	Ah	Ac	Ah
E.coli	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B.subtilis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
M.luteus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-) inhibition ; (+) croissance/développement

Ac: *Artemisia campestris*

Ah: *Artemisia herba alba*

**Tableau 5.11** : Les valeurs des CMI des H.Es testées en ( $\mu\text{l/ml}$ ).

	CMI $\mu\text{l/ml}$		
	<i>E.coli</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>M.luteus</i>
HE <i>Artemisia herba alb</i> Asso	31,25	15,62	0,97
HE <i>Artemisia campestris</i> L	15,62	7,81	0,97

Les résultats de la diffusion sur gélose ont montré que les H.Es testées sont caractérisées par une faible activité antifongique contre les trois mycéliums étudiés. En revanche nos H.Es d'*A.campestris* et *A.herba alba* ont révélé une activité antibactérienne intéressante. Les CMI ont été calculées pour les H.Es qui ont préalablement exhibé un effet antibactérien important contre les trois bactéries étudiés *E.coli*, *B.subtilis*, *M.luteus*.

Les valeurs de la CMI de l'HE d'*A.herba alba* varient de 0.97 à 31.25  $\mu\text{l/ml}$  et de 0.97 à 15.62  $\mu\text{l/ml}$  pour l' HE d'*A.campestris*.

Pour la bactérie *M.luteus*, les H.Es d'*A.campestris* et *A.herba alba* ont montré un effet inhibiteur à la dilution de 0,1%. Ainsi le Gram (+) *M.luteus* c'est le microorganisme le plus sensible ce qui correspond à la valeur la plus faible de la CMI (0.97  $\mu\text{l/ml}$ ). par contre les résultats de la CMI indique que *E.coli* Gram (-) était résistante à l'effet de l'HE d'*A.herba alba* jusqu'à la valeur de 31.25  $\mu\text{l/ml}$  et jusqu'à 15.62  $\mu\text{l/ml}$  pour l'HE d'*A.campestris*.

D'après les CMI obtenues l'H.E d'*A.campestris* a montré une meilleure performance antimicrobienne par rapport à l'HE d'*A.herba alba* vis-à-vis de toutes les bactéries testées.

GHAMNI et al. [27] ont étudié l'activité antimicrobienne des l'H.Es d'*A.herba alba* collectés aux cours de différentes périodes de l'année contre deux types de bactéries à Gram positif (*B.subtilis*, *M.luteus*) et Gram négatif (*E.coli*). Les résultats obtenus ont montré que la concentration de 1/500 v/v était suffisante pour inhiber les trois bactéries *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et *Micrococcus luteus*.

MUJEEB UR RAHMAN et al. [202], ont testé l'effet antibactérien de l'HE de *Ferula assafoetid* contre les mêmes bactéries. Les résultats ont montré une CMI de 110 µg/ml, 165 µg/ml, 115 µg/ml pour *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et *Micrococcus luteus* respectivement.

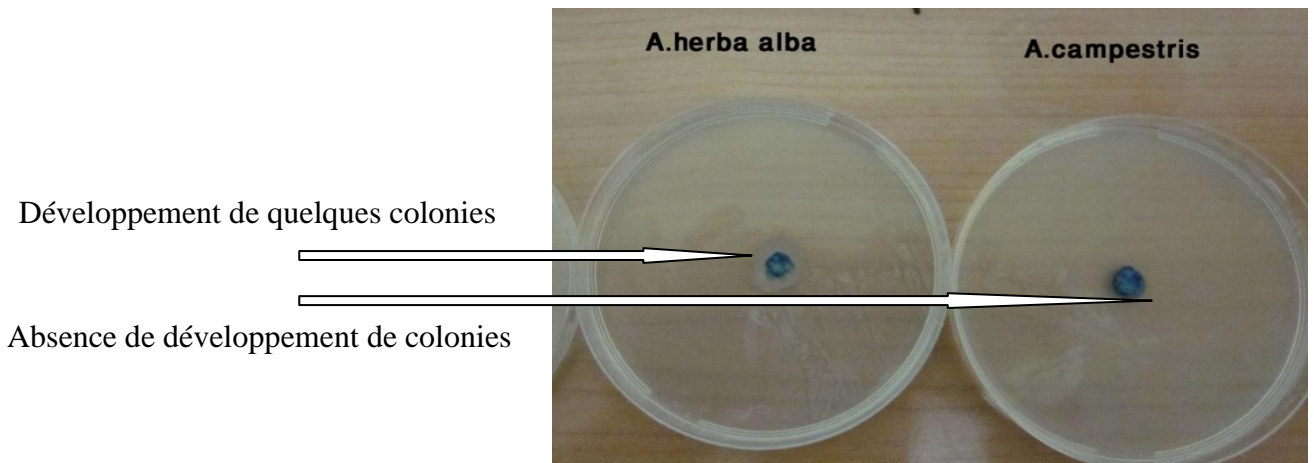
DERWICHE et al. [211] ont évalué le pouvoir antibavterien de l'HE de *Mentha Pulegium* du Maroc contre *Escherichia coli* et *Micrococcus luteus*. Cette huile présente des CMI de 0.19, 0.41 mg/ml respectivement vis-à-vis *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*. D'après ces mêmes auteurs *M.luteus* est la souche la plus sensible.

GULLUCE et al. [212] ont réalisé une étude sur la détermination de l'activité antimicrobienne et antioxydante de l'HE de *Mentha longifolia L. ssp. Longifoliad* contre 23 bactéries et 15 mycéliums. Les résultats ont montré une CMI de 31,25 µg/ml vis-à-vis d'*E.coli* et de 62.50 µg/ml pour *B.subtilis*.

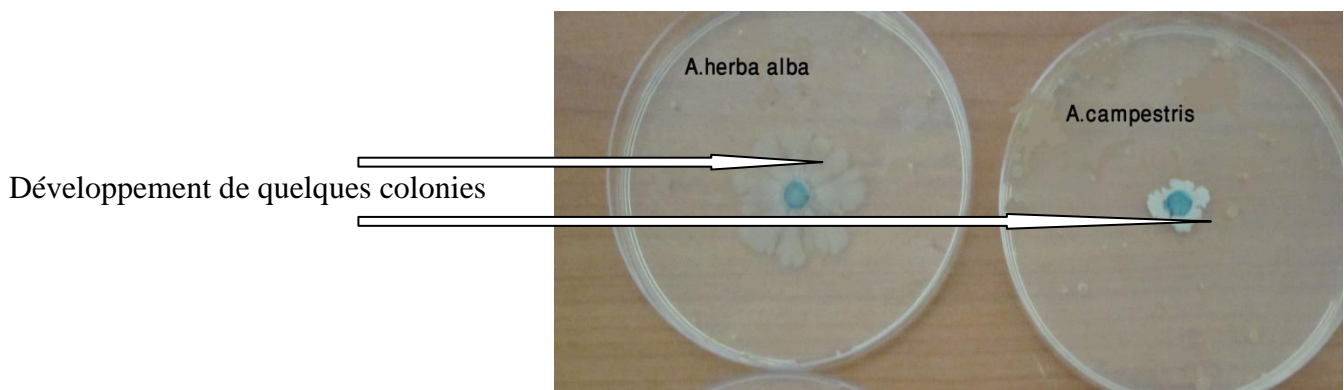
Le pouvoir inhibiteur des huiles essentielles vis-à-vis d'une souche microbienne est classé en: excellent pouvoir inhibiteur pour des CMI < 50 µl/ml, pouvoir inhibiteur intéressant pour des CMI entre 50 µl/ml et 250 µl/ml, faible pouvoir inhibiteur pour des CMI entre 250 µl/ml et 500 µl/ml et pouvoir inhibiteur médiocre ou nul pour des CMI > 500 µl/ml [203]. On peut déduire que les deux huiles essentielles ont un pouvoir inhibiteur excellent sur les trois souches bactériennes.

#### 5.6. Nature de l'activité antibiotique de l'huile essentielle d'*A. herba alba* et d'*A.campestris* :

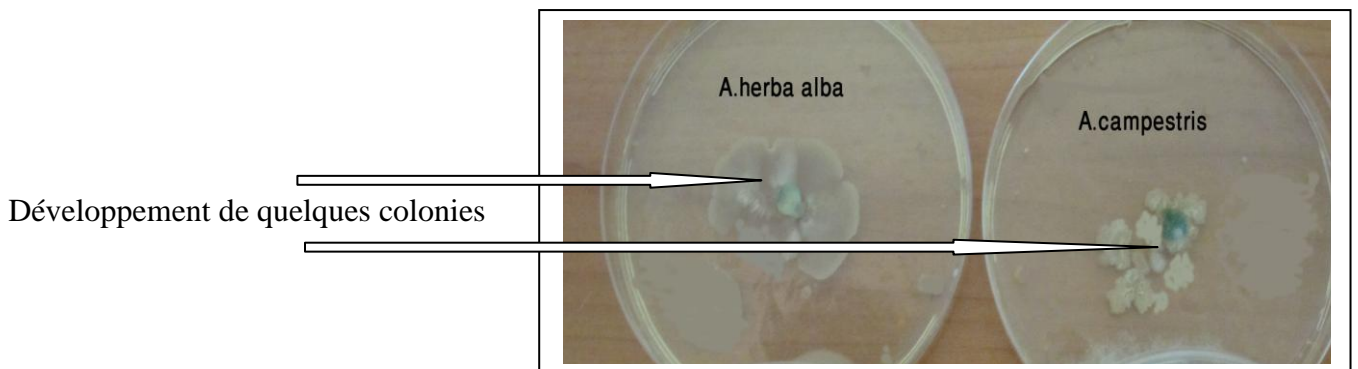
Les résultats des tests de la détermination de la nature de l'activité antibiotique de l'huile essentielle de l'armoise blanche et l'armoise champêtre sur les bactéries étudiées sont représentés dans les figures 5.17, 5.18 et 5.19.



**Figure 5.17:** Photographie montrant la nature de l'activité antibiotique des H.E de l'*A. herba alba* Asso et de l'*A. campestris* L sur *Micrococcus luteus*.



**Figure 5.18:** Photographie montrant la nature de l'activité antibiotique des H.E de l'*A. herba alba* Asso et de l'*A. campestris* L sur *Escherichia coli*.



**Figure 5.19:** Photographie montrant la nature de l'activité antibiotique des H.E de l'*A. herba alba* Asso et de l'*A. campestris* L sur *Bacillus subtilis*.

Pour l'H.E de l'*A.campestris*, la figure montre qu'il y'a développement de quelques colonies de *Bacillus subtilis* et *Escherichia colis* après repiquage, contrairement à *Micrococcus luteus* où on observe l'absence de développement des colonies de ce germe.

Nous en déduisons que l'effet de l'huile essentielle de l'*A.campestris* est bactéricide à l'égard de *Micrococcus luteus*, ce qui est en accord avec les résultats de FRIEDMAN [213], qui a confirmé l'effet bactéricide de sept substances d'origine naturelle (carvacrol, l'huile d'origan, l'huile de thym, perillaldehyde,  $\beta$ -résorcylique, acide dopamine ) contre *M. luteus*, ce qui a été expliqué par la sensibilité de ce germe. Concernant *Bacillus subtilis* et *Escherichia coli* cette huile à un effet bactériostatique. Des résultats similaires ont été obtenus par KABOUCHEA et al. [214] en testant les huiles essentielles de cinq espèces de Lamiaceae algérienne, *Thymus Numidicus*, *Thymus fontanesii*, *Teucrium polium subsp. aurasiacum*, *Teucrium atratum* et *Rosmarinus officinalis*.

De manière globale, les HE contenant des monoterpènes hydrocarbonés et des monoterpènes oxygénés présentent un effet bactéricide [215].

D'après les observations faites après le repiquage, l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* possède un effet bactériostatique contre toutes les souches bactériennes testées (*Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*). Ces résultats concordent avec les travaux de GHANMI et al. [27] qui ont testé l'effet antibactérien de l'H.E de l'armoise blanche du Maroc contre les mêmes souches bactériennes. Les résultats ont indiqué que cette huile est active contre toutes les souches de bactéries.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les huiles essentielles sont connues pour être douées de propriétés antiseptiques et antimicrobiennes. Beaucoup d'entre elles, ont des propriétés anti-toxiques, anti-venimeuses, anti-virales, anti-oxydantes, et antiparasitaires. Plus récemment, on leur reconnaît également des propriétés anti-cancéreuses [79].

Au cours de ce travail, nous avons étudié la composition chimique et l'activité antibactérienne et antifongique des huiles essentielles de deux espèces d'*Artemisia* de la région de Djelfa.

- ↳ La détermination des rendements en huiles essentielles ont montré une rentabilité en huile volatile chez l'espèce *A. herba alba* Asso (0.7 %), alors qu'il s'affaiblit chez *A. campestris* L (0.3%).
- ↳ Les résultats de l'analyse qualitative et quantitative des huiles essentielles d'*A. herba alba* et d'*A. campestris* par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse indiquent :
  - ⊛ Un chemotype riche en monoterpènes pour l'huile essentielle d'*A. campestris* L. dominé par le  $\beta$ -pinène (20,75 %) et du limonène (10,46%) et du  $\gamma$ -terpinene (10,18 %).
  - ⊛ Une abondance d'espèces chimiques sésquiterpéniques avec un chemotype davanone pour l'huile essentielle d'*A. herba alba* Asso.

L'armoise blanche de la région de Djelfa est une véritable mine de molécule naturelle très intéressante. Par exemple la davanone qui est un produit très intéressant sur le marché international. Elle rentre particulièrement dans la formulation d'arômes pour l'industrie du tabac. La davanone est également utilisée dans la composition de divers arômes pour la charcuterie et bien d'autres produits. La parfumerie en utilise également. Or, il existe actuellement un seul producteur dans le monde, l'Inde où l'HE est extraite à partir de l'*Artemisia pallens* [216].

- ↳ Dans le criblage préliminaire, complété par une mesure de la concentration minimale inhibitrice de l'extrait naturel :

- ✪ L'huile extraite des feuilles d'*A. campestris* L s'est avérée un agent bactéricide contre *Micrococcus luteus* et un agent bactériostatique efficace contre *Bacillus subtilis* et *Escherichia coli*
- ✪ L'huile essentielle d'*A. herba alba* Assoest moins efficace que celui d'*A. campestris* L mais elle a toujours une activité antibactérienne contre les trois souches *Micrococcus luteus* , *Bacillus subtilis* et *Escherichia coli*.
- ✪ Cependant les deux huiles essentielles sont inactives contre tous les champignons testés *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus flavus* et *Penicillium expansum*

L'ensemble de ces résultats obtenus in vitro ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances de source naturelle biologiquement active. Des essais complémentaires seront nécessaire et devront pouvoir confirmer les performances mises en évidence.

De nouvelles perspectives peuvent être envisagées par une étude plus poussée de l'activité antibactérienne, et antifongique non seulement sur les H.Es utilisées seules ou leurs composants majoritaires, mais également en mélange, permettant ainsi une éventuelle synergie. Il serait intéressant de continuer ces travaux notamment sur d'autres bactéries pathogènes, afin de confirmer l'efficacité ou non des H.E d'*Artemisia* .

On peut conclure que la flore algérienne peut constituer une réserve importante d'espèces végétales intéressantes, dont les principes actifs peuvent être employés dans plusieurs domaines tels que les industries agroalimentaire et pharmaceutique.



## REFERENCES

- [1] Adebayo, C.O & Aderiye, B.L., “Antifungal activity of bacteriocins of lactic acid bacteria from some Nigerian fermented foods”. *Research Journal of Microbiology*, n° 5, (2010), 1070-1082.
- [2] Nagendra Prasad, M.N., Shankara bhat, S et Sreenivasa, M. Y., “Antifungal activity of essential oils against *Phomopsis azadirachtae*-the causative agent of dieback disease of neem”, *Journal of Agricultural Technology*, n° 6, (2010), 127-133.
- [3] Serrano, M.A., Martinez-romero, D., Guille, N .F., Valverde, J.M., Zapata, P.J., Castillo, S et Valero, D., “The addition of essential oils to MAPas a tool to maintain the overall quality of fruits”. *Trends in Food Science & Technology*, n° 19, (2008), 464-471.
- [4] Baykan erel, S., Reznicek, G., Şenol, S.G., Karabay, yavaşoğul, N.U., Konyalioğlu, S., Zeybek, A.U., “Antimicrobial and antioxidant properties of *Artemisia L.* species from western Anatolia”, *Turk. J.Biol*, n° 35, (2011), 1-10.
- [5] Chier, A., Juteau, F., Bessiere, J.M., Masotti, V., Viano, J., « Impact du séchage sur la composition de l'huile essentielle d'*Artemisia campestris* var. *glutinosa* », *Société française de chimie Section ACA XVe, Journée de la Chimie, Résumé*, (2002).
- [6] Gaussen, H., Leroy, f.J et Ozenda, P., « Précis de botanique : 2. végétaux supérieures », 2 ème édition, (1982).
- [7] Osborn, R.W., Samblanx, G.W., Thevissen, K., Goderis, I., Torrekens, S., Leuven, F., Attenborough, S., Rees, S.B et Broekaert, W.F., “Isolation and characterisation of plant defensins from seeds of Asteraceae, Fabaceae, Hippocastanaceae and Saxifragaceae”, *FEBS Letters*, n° 368, (1995), 257-262.
- [8] Trease, G.E et Evans, W.C., « Pharmacognosy ». Baillière Tiddall, Eastbourne, (1983).
- [9] UNESCO., « Les plantes médicinales des régions arides. Recherches sur les zones arides », Paris, (1960), 22-23.
- [10] Mohsen, H & ALI, F., “Study of genetic polymorphism of *Artemisia herba-alba* from Tunisia using ISSR markers”, *African J. of Biotechnol*, V. 7 n°1, (2008), 44-50.
- [11] Efferth, T., “Antiplasmodial and antitumor activity of artemisinin-from bench to bedside”, *Planta Med*, n°73, (2007), 299-309.
- [12] Dob, T., Benabdelkader, T., “Chemical composition of the essential oil of *Artemisia herba-alba* Asso grown in Algeria”, *J. Essen. Oil. Res*, n° 18, (2006), 685
- [13] Aidoud, A., « Les écosystèmes à armoise blanche (*Artemisia herba alba* Asso : caractères, généraux », *Biocénoses*, n° 3, (1988), 1-15
- [14] Nègre, R., « Petite flore des régions arides du Maroc occidental », *Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS.)*, Paris, Tome 2, (1962), 566p.
- [15] Quezel, P., Santa, S., « Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales », (1963), CNRS, Paris, France.

- [16] Haouari, M., Ferchichi, A., « Utilisation des marqueurs ISSR pour l'étude du polymorphisme génétique à *Artemisia herba-alba* », CIHEAM-IAMZ, (Cahiers Options Méditerranéennes, n° 62, (2004), 489.
- [17] Salido, S., Valenzuela, L.R., Altarejos, J., Nogueras, M., Sanchez, A., Cano, E., “Composition and infraspecific variability of *Artemisia herba-alba* from southern Spain”, *Biochem. Syst. Ecol*, n° 32, (2004), 265-277.
- [18] Kaabeche, M., « Ecologie des parcours steppiques », Document de cours de Magistère, Centre Universitaire Ziane Achour – Djelfa, (2003).
- [19] Ayad, N., « Etude éco-phytochimique et apport nutritionnel de l'armoise blanche (*Artemisia herba-alba* Asso) du sud Oranais, dans l'aliment du cheptel », Thèse de doctorat, Univ. Djillali Liabes, (2008), 98p.
- [20] Rhaffari, L., « Catalogue des plantes potentielles pour la conception de tisanes », L'organisation non gouvernementale italienne MOVIMONDO, (2008).
- [21] Djebaili, S., 1984 –« Steppe Algérienne », *Phytosociologie et écologie*. Ed. Office des Publications Universitaires, 1. Place centrale de Ben Aknoun (Alger), (1984), 159p.
- [22] Aidoud, A., Le floch, E., le houero, H.N., « Les steppes arides du nord de l'Afrique », *Science et changements planétaires / Sécheresse*, V. 77 n°1, (2006), 19-30.
- [23] Bougoutaya, Y., « Contribution à la prospection et l'évaluation de la variabilité génétique de l'armoise blanche (*Artemisia herba-alba* Asso) dans une zone steppique », Thèse de Magister. Option : Agro-pastoralisme et Désertification, Université Ziane Achour, Djelfa, Algérie, (2009), 34-45pp.
- [24] Abou el-hamd H., Magdi A., Mohamed E., Soleiman E., Abeer M., Naglaa S. 2009- Chemical Constituents and Biological Activities of *Artemisia herba-alba*. *Records of Natural Products*, 4(1): 1-25.
- [25] Khenouf, S., Iratni, N., Baghiani, A., Harzallah, D., Arrar, L., “Antioxidant and antibacterial activities of extracts from *Artemisia herba alba* Asso. leaves and some phenolic compounds”, *Journal of Medicinal Plants Research* , V. 4 n° 13, (2010), 1275-1278.
- [26] Feuerstein, I., Mueller, K., Hobert, A., Segal, R., “Constitution of essential oils from *Artemisia herba-alba* populations of Israel and Sinai”, *Phytochemistry*, n° 25, (1986), 2343-2347.
- [27] Ghanmi, M., Satrani, B., Aafi, A., Isamili, M.R., Houti, H., El monfalouti, H., Benchakroun, K.H., Aberchane, M., Harki, L., Boukir, A., Chaouch, A., Charrouf, Z., « Effet de la date de récolte sur le rendement, la composition chimique et la bioactivité des huiles essentielles de l'armoise blanche (*Artemisia herba-alba*) de la région de Guerçif (Maroc oriental) », *Phytothérapie*, n° 8, (2010), 295–301.
- [28] Baba aissa, F., « Encyclopédie des plantes utiles ». Librairie moderne, (1999), Alger, Algérie.
- [29] Haouari, M., Ferchichi, A., “Essential oil composition of *Artemisia herba-alba* from southern Tunisia”, *Molecules*, n° 14, (2009), 1585-1594.
- [30] Akrouf, A., “Essential oil study of some pastoral plants from Matmata (south Tunisia)”, *Cah. Options Med*, n° 62, (2004), 289-292.

- [31] Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker P., Vidal, N., "Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds". *Food Chemistry*, n° 97, (2006), 654-660.
- [32] Al-khazraji, S.M., Al-shamaony, L.A., Twaiji H.A., "Hypoglycemic activity of *Artemisia herba-alba*. Effect of different parts and influence of the solvent on hypoglycemic activity". *J Ethnopharmacol*, n° 40, (1993), 163.
- [33] Al-quran, S., "Ethnopharmacological survey of wild medicinal plants in Showbak, Jordan". *J Ethnopharmacol*, n° 123, (2009), 45.
- [34] Al-shamaony, L.A., Al-khazraji, S.M., Twaiji, H.A., "Hypoglycemic effect of *Artemisia herba-alba*. II. Effect of valuable extract on some blood parameters in diabetic animals", *J. Ethnopharmacol*, n° 43, (1994), 167.
- [36] El bahri, L., Chemli, R., "Artemisia campestris L: a poisonous plant of North Africa", *Vet .Hum .Toxicol*, V. 39 n° 5, (1997).
- [37] Chalchat, J., Cabassu, P., Petrovic, S.D., Maksimovic, Z.A., Gorunovic, M.S., « Composition de l'huile essentielle d'*Artemisia campestris* L de la Serbie ». *J. Essen. Oil Res*, n° 13, (2003), 785-790.
- [38] Jurga, B., Rita, B., Eugenija, K., Isabelle, L., Veronique, M., « Caryophyllène riches en oxyde huiles essentielles d'*Artemisia campestris* L. de Lituanie et leur toxicité », (2008).
- [39] Fabien, J., Veronique, M., Jean-Marie, B., Josette, V., "Compositional characteristics of the essential oil of *Artemisia campestris* var. *glutinosa*", *Biochemical Systematics and Ecology*, V. 30 n° 11, (2002), 1065-1070.
- [41] Akrouf, A., El jani, H., Amouri, S., Neffati, M., "Screening of Antiradical and Antibacterial Activities of Essential Oils of *Artemisia campestris* L., *Artemisia herba alba* Asso, & *Thymus capitatus* Hoff. Et Link. Growing Wild in the Southern of Tunisia", *Science and technology*, V. 2 n°1, (2010), 29-39.
- [42] Akrouf, A., Chemli, M., Simmonds, G., Kite, M., Hammami, M., Chreif, I., "Seasonal variation of the essential oil of *Artemisia campestris* L", *Journal of Essential Oil Research*, n°15, (2003), 333-336.
- [43] Aniya, Y., Shimabukuro, M., Shimoji, M., Kohatsu, M., Gyamfi, M.A., Miyagi, C., Kunii, D., Takayama, F., Gashira, E. 2000- Antioxidant and hepatoprotective actions of the medicinal herb *Artemisia campestris* from the Okinawa Islands *T. Biol. Pharm. Bull.*, 23(3), 309-312.
- [44] Viaud, H., « Les huiles essentielles et leur distillation », Edition GNOM, (1993), 126p.
- [45] Penoel, J., « L'aromathérapie, clef de la médecine systémique », (1999), 241p.
- [46] Young, J., 2002 –« La santé au naturel », (2002).
- [47] Zhiri, A., « Les huiles essentielles un pouvoir antimicrobien avéré », *Nutra News.Science, Nutrition, Prévention et santé*, Edité par la Fondation pour le libre choix, (2006), 12-8p.
- [48] Schauenberg, P., Paris F., « Guide des plantes médicinales », Edition Delachaux Nistlé S.A, Paris, (1977), 396p.

- [49] AFNOR NF T-75- 111, 112 & 202: (Association Française de Normalisation, Norme). « Huiles essentielles ». Paris, France.
- [50] Bruneton, J., « Pharmacognosie, phytochimie. Plantes médicinales », Edition Technique et documentation, 3<sup>ème</sup> Edition, Lavoisier, Paris, (1999), 1095p.
- [51] Guignard, J., Cosson, L., Henry, M., « Abrégé de phytochimie ». Edition Masson, Paris, (1985), 255p.
- [52] Teusher, E., Anton, R., Lobstein, A., « Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles », Tec & Doc, Paris, (2005), 522p.
- [54] Fahn, A., “Secretory tissue in vascular plants”. *New Phytologist*, n° 108, (1988), 229–257.
- [55] Salle, J., « Le totum en phytothérapie », Edition Frison-Roche, Paris, (1991), 13-60.
- [56] Gaucher, I., Lusson, J., « Projet génie agro-alimentaire, industrie alimentaire et biologique », (2011), <http://www.perso.wanadoo-Fr/j-I/GiA/GiA index.-html>.
- [57] Charpentier, B., Hamon-lorleac’h, F., Harlay, A., Huard, A., Ridoux, L., Chanselle, S., « Guide du préparateur en pharmacie ». 3<sup>ème</sup> édition, Elsevier Masson, (2008), 1358p.
- [58] Bruneton, J., « Pharmacognosie, phytochimie. Plantes médicinales », Edition Technique et documentation, 2<sup>ème</sup> Edition Lavoisier, Paris, (1993), 915p.
- [59] Svoboda, K.P., hampson, J.B., “Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities”, Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK., KA6 5HW, (1999).
- [60] Bekhechi, C., Atik-bekkara, F., Abdel ouahid, D.E., « Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles d’*Origanum glandulosum* d’Algérie », *Phytothérapie*, n° 6, (2008), 153-159.
- [61] Kaloustian, J., Chevalier, J., Mikail, C., Martino, M., Abou, L., Vergnes, M.F., « Etude de six huiles essentielles : composition chimique et activité antibactérienne », *Phytothérapie*, n° 6, (2008), 160-164.
- [62] Hernandez-ochoa, L.R., « Substitution de solvants et matières actives de synthèse par combiné « Solvant/ Actif ». D’origine végétale ». Thèse de Doctoratde l’Institut National Polytechniques de Toulouse, France, (2005), 81p.
- [63] Paris, M., Hurabielle, M., « Abrégé de matière médicale (pharmacognosie) », Tome I, Edition Masson, Paris, (1981), 339p.
- [64] Loomis, D., Croteau, R., “Biochemistry of Terpenoids: A Comprehensive Treatise. In: P. K. Stumpf and E. E. Conn (eds.) the Biochemistry of Plants. Lipids: Structure and Function”, Academic Press, San Francisco, n° 4, (1980), 364-410.
- [65] Lahlou, M., “Methods to study the phytochemistry and bioactivity of the essential oils”- *Phytotherapy research*, n°18, (2004), 435-448.
- [66] Gherman, C., Culea, M., Cozar, O., “Comparative analysis of some active principles of herb plants by GC/MS- Talanta”, n° 53, (2000), 253-262.

- [67] Dorman, H.J.D., Deans, S.G., “Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils”, *Journal of Applied Microbiology*, V. 88 n° 2, (2000), 308-316.
- [68] Loziene, K., Venskutonis, P.R., Sipailiene, A., Labokas J., “Radical scavenging and antibacterial properties of the extracts from different *Thymus pulegioides* L. chemotypes”, *Food Chemistry*, n°103, (2007), 546-559.
- [69] Lee, S.J., Umamo, K., Shibamoto, T., Lee, K.G., “Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum*L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris*L.) and their antioxidant properties”, *Food Chemistry*, n°91, (2005), 131-137.
- [70] Schammle, B., Winkelhausen, E., Kuzmanova, S., Steiner, W., “Isolation of carvacrol assimilating microorganisms”, *Food Technol. Biotechnol*, V. 39 n° 4, (2001),1-345.
- [71] Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, H.A., Daferera, D., Polissiou, M., Sokmen, A., “Antioxidative activity of the essential oils of *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *sipyleus* and *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *rosulans*”, *Journal of Food Engineering*, n° 66, (2005), 447-454.
- [72] Michiels, J., Missotten, J., Fremaut, D., Desmet, S., Dierick, N., “In vitro doseresponse of carvacrol, thymol, eugenol and trans-cinnamaldehyde and interaction of combinations for the antimicrobial activity against the pig gut flora”, *Livestock Science*, n° 109, (2007), 157-160.
- [73] Botelho, M.A., Nogueira, N.A.P., Bastos, G.M., Fonseca, S.G.C., Lemos, T.L.G., Matos, F.J.A., Montenegro, D., Heukelbach, J., Rao, V.S., Brito G.A.C., “Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens *Lippia sidoides* essential oil against oral pathogens”, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, n° 40, (2007),349-356.
- [74] Bagamboula, C.F., Uyttendaele, M., Debevere, J., “Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*”, *Food Microbiology*, n° 21, (2004), 33-42.
- [75] Marianne, P., « Etude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore aurentienne : composition chimique, activité pharmacologiques et hémi-synthèse », Thèse comme exigence partielle de la maîtrise en ressources renouvelables. Université du Québec à Chicoutimi, (2008), 14p.
- [76] Thompson, J.D., Chalchat, J.C., Michet, A., Linhart, Y.B., Ehlers, B., “Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes”, *J. Chem. Ecol*, n° 29, (2003), 859-880.
- [77] Mockute, D., Bernotiene, G., Judzentiene, A., “The essential oil of *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* growing wild in Vilnius district (Lithuania)”, *Phytochemistry*, n° 57, (2001),65-69.
- [78] Edris, A.E., “Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents, A review. *Phytother. Res*, n° 21, (2007), 308-323.
- [79] Franchomme, P., Penoël, D. 1990 –« L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles », Roger Jallois éditeur, Limoges, (1990) ,445p.

- [80] Smallfield, B., "Introduction to growing herbs for essential oils, medicinal and culinary purposes", *Crop & Food Research*, n° 45, (2001),4p.
- [81] Rayour, K ., "Mechanism of bactericidal action of oregano and clove essential oils and of their phenolic major components in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*", *The Journal of Essential oil Research*, n° 86, (2003),985-990.
- [82] Pauli, A., "Antimicrobial properties of essential oil constituents", *International Journal of Aromatherapy*, n° 11, (2001), 126-133.
- [83] Freeman, L., Carel, Y., « Aromathérapie. NUTRA NEWS Science, Nutrition, Prévention et Santé, (2006), [http:// www. nutranews.org](http://www.nutranews.org)
- [84] Rasooli, I., Bagher, R.M., Allameh, A., "Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus Niger* by essential oils from *Thymus Eriocalyx* and *Thymus x-porlock*", *Food Control*, n°17, (2006), 359-364.
- [85] Barral, J., Boivin, J., Coudurier, S., Desmazieres, C., Gonzalez, A., Guidez, F., Lapotre, A., Megy, F., « Valorisation des effets antimicrobiens de l'huile essentielle de lavandin Grosso ». ONIPPAM, (2007) ,1- 67.
- [86] Caillet, S., Lacroi, M., « Les huiles essentielles: leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire », *Laboratoire de Recherche en Sciences Appliquées à l'Alimentation (RESALA) de l'INRS - Institut Armand - Frappier, Université de Laval (Québec)*, (2007), 92-107.
- [87] Chami, F., "Oregano and clove essential oils induce surface alteration of *Sccharomyces cerevisiae*", *Phytother. Res*, n°19, (2005), 405-408.
- [88] Siddiqui, Y.M., et Tayebi, M., Haddad, A.M & Al-ahdal, M.N., "Effect of essential oils on the enveloped viruses : antiviral activity of oregano and clove oils on herpes simplex virus type 1 and Newcastle disease virus". *Med. Sci.Res*, n°24, (1996), 185-186.
- [89] Schnitzler, P., Schon, K., Reichling, J., "Antiviral activity of australian tea oil and eucalyptus oil against herpes simplex virus in cell culture", *Phamazie*, V. 56 n°4, (2001), 343-347.
- [90] Burt, S.A., Reinders, R.D., "Antibacterial activity of selected plant essential oils againts *E. coli* O 157:H7". *Letters in Applied Microbiology*, V. 36 n° 3, (2003), 16 - 167.
- [91] Pibiri, M.C., « Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huile essentielle », *Thèse de Doctoral, Polytechniques Fédérale de Lausanne*, (2005), 42-47p.
- [92] Mangena, T., Muyima, N.Y., "Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of *Artemisia afra*, *Pteronia incana* and *Romarinus officinalis* on selected bacteria and yeast strains", *Lett Appl Microbiol* , V. 28 n°4, (1999), 291-296.
- [93] Magiatis, P., Melliou, E., Skaltsounis, A.L., Chinou, I.B., Mitaku, S., "Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Pistacia lentiscus* var. *chia*", *Planta Med*, V. 65 n° 8, (1999), 749-752.
- [94] Boubrit, S., Boussad, N., « Détermination "in vitro " du pouvoir antibactérien des huiles essentielles d'eucalyptus, myrte, clous de girofle et sarriette, et leur application à

- la conservation de la viande fraîche type hachée », (2007), Thèse Ingénieur d'état en biologie, option contrôle de la qualité et analyses, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. [http://www.memoireonline.com/10/11/4897/m\\_Determination-in-vitro--du-pouvoir-antibacterien-des-huiles-essentielles-deucalyptus-myrtle-5.html](http://www.memoireonline.com/10/11/4897/m_Determination-in-vitro--du-pouvoir-antibacterien-des-huiles-essentielles-deucalyptus-myrtle-5.html)
- [95] Montessori, V., Phillips, P., Montaner, J., Haley, L., Craib, K., Bessuille, E., Black, W., "Species distribution in human immunodeficiency virus-related mycobacterial infectious: implications for selection of initial treatment". Clin. Infect. Dis, n° 22, (1996), 989-992.
- [96] Osawa, K., Matsumoto, T., Mruyama, T., Tkiguchi, T., Takazoe, I., "Studies of the antibacterial activity of plant extracts and their components against periodontopathic bacteria". Bull. Tokyo. Dent. Coll, V. 31 n°1, (1990), 17-21.
- [97] Mahmoud, B.S.M., Yamazaki, K., Il-shik, S., Dong-suk, C., Suzuki, T., "Bacterial microflora of carp (*Cyprinus carpio*) and its shelf-life extension by essential oil compounds", Food Microbiology, V. 21 n° 6, (2004), 657-666.
- [98] Gordon, R. E., Haynes, W. C., Pang, C.H.N., "The genus *Bacillus*". Agriculture Handbook. N° 427, ARS-USDA, Washington (USA), (1973).
- [99] Guesmi, A., Boudabous, A., « Activité antimicrobienne de cinq huiles essentielles associées dans les produits de thalassothérapie »- les Plantes à Parfum, aromatiques et médicinales. Faculté des Sciences de Tunis, Université Tunis - El Manar, 2092, Tunis, (2006).
- [100] Bousbia, N., « Extraction et identification de quelques huiles essentielles (nigelle, coriandre, origan, thym, romarin), étude de leurs activités antibactériennes ». Thèse de Magistère, Option Sciences Alimentaires, INA. Algérie, (2004), 31-45p.
- [101] Fauchere, J.L., Avril, J.L., « Bactériologie générale et médicale », Ellipses éditent, Paris, (2002), 365.
- [102] Guerin-fauble, V., Carret, G., « L'antibiogramme, principes, méthodologie, intérêt et limites », Journées Nationales GTV- INRA, (1999), 5-12.
- [103] Robert-demuet, S., « Méthodes de dilutions. In Antibiotiques et antibiogrammes », (1995), 131-137. Montréal-Canada.
- [104] Malecky, M., « Métabolisme des terpénoïdes chez les caprins », Thèse de Doctorat de l'institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro. Paris, Tech.), (2007), 141p.
- [105] Tassou, C.C., Drosinos, E.H., Nychas, G.J.E., "Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella* Enteritidis and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4 and 10°C", Journal of Applied Bacteriology, n° 78, (1995), 593-600.
- [106] Mejlholm, O., Dalgaard, P., "Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products", Letters in Applied Microbiology, n° 34, (2002), 27-31.
- [107] Poole, K., "Multidrug resistance in Gram-negative bacteria", Current Opinion in Microbiology, n° 4, (2001), 500-508.

- [108] Mann, C.M., Markham, J.L., “A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils”, *Journal of Applied Microbiology*, n° 84, (1998), 538-544.
- [109] Haddouchi, F., Lazouni, H., Ahammer, K.A., Carson, C.F., Riley, T.V., “Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts”, *Journal of Applied Microbiology*, n° 86, (1999), 985-990.
- [110] Garnero, J., « Les huiles essentielles, leur obtention, leur composition, leur analyse et leur normalisation », Editions techniques- Encyclopédie des médecines naturelles. (Paris, France), phytothérapie, Aromathérapie, n° 2, (1991), 2-20.
- [111] Belaïche, P., « Traité de phytothérapie et d'aromathérapie, Tome1, l'aromatogramme. Maloine S.A. EDITEUR, Paris, (1979), 204p.
- [112] Padrini, F., Lucheroni, M. T., « Le grand livre des huiles essentielles - guide pratique pour retrouver vitalité, bien-être et beauté avec les essences et L'aromassage Energetiques avec Plus de 100 Photographies ». Edition De Vecchi, Paris, (1996), 11, 15, 61, 111p.
- [113] Roux, D., « Conseil en aromathérapie », 2ème édition, Pro-Officina, (2008), 187.
- [114] Mengal, P., Behn, D., Gil, M.B., Mompon, B., « Extraction d'huile essentielle par micro-ondes, Parfums, Cosmétiques, Arômes », n°114, (1993), 66-67.
- [115] Adio, A.M., “Isolation and Structure Elucidation of Sesquiterpenoids from the Essential Oils of Some Liverworts (Hepaticae)”. Thèse pour le degré du Dr. rer. National à l'institut de la chimie organique, université de Hambourg, (2005), 280p.
- [116] Cavalli, J.F., « Caractérisation par CPG/IK, CPG/SM et RMN du carbone-13 d'huiles essentielles de Madagascar », Thèse de doctorat en Chimie Organique et Analytique, université de Corse Pascal Paoli, (2002), 124p.
- [117] Arpino, P., Prevot, A., Serpinet, J., Tranchant, J., Vergnol, A., Wittier, P., « Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse », édition Masson, Paris, (1995).
- [118] Bouchonnet, S., Libong, D., « Le couplage chromatographique en phase gazeuse-spectrométrie de masse », Département de Chimie, Laboratoire des Mécanismes Réactionnels. Ecole Polytechnique, PALAISEAU Cedex, (2002).
- [119] Bouchra, C., Achouri, M., Hassani, L.M.I., Hmamouchi, M., “Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers. Fr”, *Journal of Ethnopharmacology*, n° 89, (2003), 165-169.
- [120] Rasooli, I., Abyaneh, M.R., “Inhibitory effects of Thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*”, *Food Control*, n° 15, (2004), 479-483.
- [121] Saleh, M.A.M., Belal, H., El-baroty, G., “Fungicidal activity of *Artemisia herba-alba* Asso (Asteraceae)”. *J. of envir. sci. and health. Part B. Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes*, V. 41 n° 3, (2006), 237-244.
- [122] Yashphe, J., Segal, R., Breuer, A., Erdreich-naftali, G., “Antibacterial activity of *Artemisia herba-alba*”, *J. of Pharma. Sci*, V. 68 n°7, (1979), 924-925.
- [123] Salido, S., Altarejos, J., Nogueras, M., Sanchez, A., “Chemical composition of essential oil of *Artemisia herba alba* Asso. Ssp. Valentine (Lam.) Marc”, *J. Essent. Oil. Res*, n° 13, (2001), 221-224.



- [124] Akrouf, A., Chemli, M., Chreïf, I., Hammami, M., "Analysis of the essential oil of *Artemisia campestris* L", *Flavour. Frag. J.*, V. 16, n° 5, (2000), 337-339.
- [125] Dob, T., Dahamane, D., Beramdane, T., Chelghoum, C., "Chemical composition of the essential oil of *Artemisia campestris* L. from Algeria", *Pharm. Biol.*, V. 43 n°6, (2005), 512-514.
- [126] Hatimi, S., Boudouma, M., Bichichi, M., Chaïb, N., Idrissi, N.G., "Evaluation in vitro of antileishmanien activity of *Artemisia herba-alba* Asso (in French)". Presented at Franco-African meeting of pediatrics N°14, Paris, (2000), France, Exotic pathology Society: Paris, France, 57-70.
- [127] Joly, B., Reynaud, A., « Entérobactéries : Systématique et Méthode de diagnostic », Tec & Doc, Lavoisier, (2002), 125p.
- [128] Berche, P., « Bactériologie générale ». PCE M 2. Faculté de médecine Necker-Enfants malades (France), (2003), 89.
- [129] Avril, J.L., « Bactériologie clinique ». 3ème Edition, (2000).
- [130] Hellal, Z., « Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*) », Thèse de magister. Option: Biochimie Appliquée et Biotechnologies. Faculté des sciences biologiques et des sciences agronomiques. Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, (2010).
- [131] Singleton, P., "Bacteria in biology, Biotechnology and medicine ", John Wiley and Sons .Ltd .New York, (1999), 233.
- [132] Kunst, F., "The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*". *Nature*, (1997), 249-256.
- [133] Delarras, C., « Microbiologie Pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire », Edition Tec & Doc, Lavoisier, Paris, (2007), 201p.
- [134] Lamnaouer, D., « Conduite d'essais d'extraction et d'analyse des huiles essentielles et des principes actifs des plantes médicinales et aromatiques ». Programme d'UICN en Afrique du Nord : Phase III (Composition chimique et activités biologiques de quelques plantes médicinales du PNT), (2002).
- [135] Marchadier, E., « Etude fonctionnelle d'un centre d'interactions protéiques chez *Bacillus subtilis* par une approche intégrée », Thèse de doctorat, spécialité science de la vie. Université Paris Xivfr Scientifique d'Orsay, (2009), 6p.
- [136] Greenblatt, C.L., Baum, J., Klein, B.Y., Nachshon, S., Koltunova, V., Cano, R.J., « *Micrococcus luteus* survival in amber », *Microb. Ecol.*, n°48, (2004), 120-7.
- [137] Mukamolova, G.V., Kell, D.B., Kaprelyants, A.S., "On resuscitation from the dormant state of *Micrococcus luteus*", *Antonie van Leeuwenhoek*, n° 73, (1998), 37-43.
- [138] Mukamolova, G.V., Murzin, A.G., Salina, E.G., Demina, G.R., Kell, D.B., Kaprelyants, A.S., Young, M., "Muralytic activity of *Micrococcus luteus* Rpf and its relationship to physiological activity in promoting bacterial growth and resuscitation", *Mol Microbiol.*, n° 59, (2006), 84-98.

- [139] Mukamolova, G.V., Kazarian, K., Telkov, M., Kaprelyants, A.S., Kell, D.B., Young M., "The rpf gene of *Micrococcus luteus* encodes an essential secreted growth factor", *Mol Microbiol*, n° 46, (2002), 611-21.
- [140] Raper, K., Fennell, D.J., "The genus *Aspergillus*", Williams and Wilkins editors, Baltimore, (1965).
- [141] Roquebert, M.F., « Taxonomie des moisissures ; Méthodes de culture et techniques d'observation" ; Identification", in "Moisissures des aliments peu hydratés" », Ed. Tec & Doc, (1998), 39-95.
- [142] Castegnaro, M., Pfohl-leszkowicz, A., « Les mycotoxines : contaminants omniprésents dans l'alimentation animale et humaine, dans La sécurité alimentaire du consommateur », Tec & Doc, Lavoisier, Paris, (2002), 221p.
- [143] Morin, O., « *Aspergillus* et aspergilloses: biologie », Ed. Techniques Encycl. Med. Chir. (Elsevier, Paris), Maladies infectieuses 8-600-A-10, (1994).
- [144] Chermette, R., Bussieras, J., « Parasitologie vétérinaire. Mycologie », Edité par le Service de Parasitologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Maisons-Alfort, (1993) ,123p.
- [145] Perrone, G., Susca, A., Cozzi, G., Ehrlich, K., Varga, J., Frisvad, J. Meijer, M., Nooni, M., Mahakarnchanakul, W, Samson, R.A., « La biodiversité des espèces d'*Aspergillus* dans certains produits agricoles importants », *Journal List Mycol Stud*, n° 59, (2007), 53-66.
- [146] Andre, E., « Champignons Mycotoxinogènes et Ochratoxine A (OTA) et Aflatoxine B1 (AFB1) dans les vignobles libanais : Occurrence et Origine », Thèse Doctorat. Spécialité : Sciences de la Vie. École doctorale Sciences et Santé. Université Saint Joseph de Beyrouth, Liban, (2007), 22-36pp.
- [147] Quatresous, N., « Aspergillose humaine. épidémiologie, diagnostic biologique, contrôle », Thèse de Docteur en Pharmacie, Faculté de Pharmacie, Université de Limoges, France, (2011), 19-21pp.
- [148] Nguyen minh tri, M., « Identification des espèces de moisissures, potentiellement productrices de mycotoxines dans le riz commercialise dans cinq provinces de la région centrale du Vietnam - étude des conditions pouvant réduire la production des mycotoxines », Thèse Doctorat, Spécialité: Génie des procédés et de l'environnement. Institut National Polytechnique de Toulouse, France, (2007), 36-44pp.
- [149] Hedayati, M.T., Pasqualotto, A. C., Warn, P. A., Bowyer, P., Denning, D. W., "Aspergillus flavus: human pathogen, allergen and mycotoxin producer", 1677, (2007).
- [150] Dong, M.L., Dian, R.X., Ruo, Y.L., Samson, R.A., Hoogd, G.S., Duan, L.W., "Aspergillus flavus myositis in a patient after liver transplantation", 509, (2008).
- [151] Atoui, A., « Approche de la mycotoxinogénèse chez *Aspergillus ochraceus* et *Aspergillus carbonarius*: études moléculaires et physiologique », Thèse Doctorat. Spécialité: Microbiologie & Biocatalyse Industrielles. Institut National Polytechnique de Toulouse, France, (2006), 11-12p.
- [152] Gams, W., Nirenberg, H.I., "A contribution to the generic definition of *Fusarium*", *Mycotaxon*, n° 35, (1998), 407-416.

- [153] Abarca, M.L., Accensi, F., Cano, J., Cabanes, F.J., “Taxonomy and significance of black aspergilla”, *Antonie van Leeuwenhoek*, n° 86, (2004), 33-49.
- [154] Paranecova, L., Benen, J.A.E., SAMSON, R.A., Visser, J., “Evaluation of RFLP analysis of the classification of selected black aspergilla”, *Mycology Research*, n° 101, (1997), 810-814.
- [155] Zimmerli, B., Dick, R., “Ochratoxin A in table wine and grape juice: occurrence and risk assessment”, *Food Additives and Contaminants*, n° 13, (1996), 655-668.
- [156] Heenan, C.N., Shaw, K.J., Pitt, J.I., “Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates and detection using coconut cream agar”, *Journal of Food Mycology*, n° 1, (1998), 67-72.
- [157] Belli, N., Ramos, A.J., Sanchis, V., Marin, S., “Incubation time and water activity effects on ochratoxin A production by *Aspergillus section Nigri* strains isolated from grapes”, *Lett. Appl. Microbiol*, n° 38, (2004), 72–77.
- [158] JECFA ., "Cinquante-sixième réunion du Comité mixte FAO / OMS d'experts sur Commitee Additifs alimentaires ochratoxine A» dans: évaluation de l'innocuité de certaines mycotoxines dans les aliments. OMS Série Additifs alimentaires de la FAO et de 47 et 74 Nutrition, (2001), Paper: 281-416.
- [159] Tabuc, C., « Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines », Thèse Doctorat. Spécialité: Pathologie, mycologie, génétique et nutrition. Institut National Polytechnique de Toulouse, France, (2007), 35-37.
- [160] Krimi bencheqroun, S., « Etude des mécanismes d'action impliqués dans le biocontrôle d'une souche d'*Aureobasidium pullulans* (De Bary) Arnaud vis-à-vis de *Penicillium expansum* Link sur pommes en post-récolte », Thèse Doctorat. Spécialité: Agro-biotechnologie. Université de Liège. Belgique, (2009), 4-5p.
- [161] Roussel, M., Lemarchand, M., Benard, M., Dreyfus, J., « La patuline », Fiche technique du service régional de la protection des végétaux de Haute-Normandie, (2007).
- [162] Zelvelder, M., Nugon-baudon, L., Mollier, P., Grosclaude, J., Mathivet, E., Magali, R., Wal, J.M., Pascal, G., « La sécurité des aliments à l'INRA », n° 13, (2001).
- [163] Ciegler, A., Kutzman, C.P., “Penicillic acid production by blue-eye fungi on various agricultural commodities”, *Applied Microbiology*, n° 20, (1970), 761-764.
- [164] Sharmaa, R.R., Singhb, D., Singhc, R., “Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists”, A review, V. 50 n° 3, (2009), 205-221.
- [165] Amarti, F., Satrani, B., Ghanmi, M., Farah, A., Aafi, A., Aarab, L., El Ajjouri, M., Chaouch, A., « Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. du Maroc », *Phytothérapie*, V.14 n°1, (2010), 342-347.

- [166] Satrani, B., Ghanmi, M., Farah, A., Aafi, A et al., « Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Cladanthus mixtus* ». Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 146, (2008), 85-96.
- [167] Benjilali, B., Tantaoui-elarki, A., Ismaili-alaoui, M., et al. « Méthode d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélose ». Plant Méd Phytothér, 20, (1986), 155-167.
- [168] Ministère de l'agriculture, ministère de la santé, de la population et de la réforme hospitalière, « Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale selon les recommandations de l'OMS », (2005), 3eme Edition.  
[www.sante.dz/aarn/documents/pdf/standardis-veto-05.pdf](http://www.sante.dz/aarn/documents/pdf/standardis-veto-05.pdf)
- [169] Ponce, A. G., Fritz, R., Del Valle, C et Roura S. I., "Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard", Lebensmittel-Wissenschaft + technologie. 36, (2003), 679-684.
- [170] Euzéby, J.P., « Évaluation in vitro de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques », Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire, (2001), <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/atbq/sensibilite.html>
- [171] Abdelgaleil, S.A.M., Abbassy, M.A., belal, A.H., "Bioactivity of two major constituents isolated from the essential oil of *Artemisia judaica* L", Bioresour Technol, V. 99 n° 13, (2007), 5947-50.
- [172] Jalali, H.M., Sereshti, H., "Determination of essential oil components of *Artemisia haussknechtii* Boiss. Using simultaneous hydrodistillation-static headspace liquid phase microextraction-gas chromatography mass spectrometry", J. Chromatogr A 1160, n° 1 & 2, (2007), 81-9.
- [173] Ghasemi, E., Yamini, Y., Bahramifar, N., "Comparative analysis of the oil and supercritical CO<sub>2</sub> extract of *Artemisia sieberi*", J. Food. Eng, V. 79 n° 1, (2006), 306-11.
- [174] Kelen, M., Tepe, B., "Chemical composition, antioxydant and antimicrobial proprieties of the essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora", Bioresource Technology, n° 99, (2008), 4096-4104.
- [175] Vekiari, S.A., Protopapadakis, E.F., Papadopoulou, P., Papanicolaou, D., Panou, C., Vamvakias, M., "Composition and seasonal variation of the essential oil from leaves and peel of a lemon variety", Journal of Agricultural and Food Chemistry, V. 5 n°1, (2002), 147-153.
- [176] Bendimerad, N., Taleb, S.A., Bendiab, A., Benabadji, B., Fernandez, X., Valette, L., Lizzani-cuvelier, L., "Composition and antibacterial activity of *Pseudocytisus integrifolius* (Salisb.) essential oil from Algeria", Journal of Agricultural and Food Chemistry, n° 53, (2005), 2947-2952.
- [177] Djenane, D., Sánchez-escalante, A., Beltrán, J.A., Roncalés, P., "Ability of  $\alpha$ -tocopherol, taurine and rosemary, in combination with vitamin C, to increase the

- oxidative stability of beef steaks packaged in modified atmosphere”, *Food Chemistry*, n° 76, (2002), 407-415.
- [178] Bouzouita, N., Kachouri, F., Ben-halima, M., Chaabouni M., « Composition chimique et activités: antioxydante, antimicrobienne et insecticide de l’huile essentielle de *Juniperus phoenicea* », *Journal de la Société Chimique de Tunisie*, n° 10, (2008), 119-125.
- [179] Djenane, D., Yangüela, J., Montañés, L., Djerbal, M., Roncalés, P., “Antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* and *Satureja montana* essential oils against *Listeria monocytogenes* CECT 935 using laboratory media; efficacy and synergistic potential in minced beef”, *Food Control*, n° 22, (2011), 1046-1053.
- [180] Belhattab, R., Boudjouref, M., Barroso, J.G., Pedro, L.P., Figueirido, A.C., “Essential oil composition from *Artemisia campestris* grow in Algeria”, *Advances in Environmental Biology*, V. 5 n° 2, (2011), 429-432.
- [181] Guven, C., « Enquêtes avec des espèces d'*Artemisia* turc. II. *Artemisia campestris* », *Folia Farmac*, n° 5, (1963), 585-591.
- Lawrence, B.M., “Progress in essential oils”, *Perfume. & Flavor*, n° 19, (1994), 83-95
- [182] Lamiri, A., Belanger, A., Berrada, M., Ismaili-alaoui, M., Benjilali, B., “Origin of chemical polymorphism of Moroccan *Artemisia herba-alba* Asso” Rabat: Morocco, *Phytochemistry*, n° 5, (1997), 81-92.
- [183] Feuerstein, I., Danin, A., Segal, R., “Constitution of the essential oil from an *Artemisia herba-alba* population of Spain”, *Phytochem*, V. 27 n°2, (1988), 433–434
- [184] Bicchi, C., Frattini, C., Sacco, T., “Essential Oils of Three Asiatic *Artemisia* Species”, *Phytochemistry*, n° 24, (1985), 2440-2442.
- [185] Lewis, Y.S., Nambudiri, E.S., “Composition of *Davana* Oil”, *Perfume Essent. Oil Rec*, V. 58 n°9, (1967), 613.
- [186] Marco, J.A., Barbera, O., “Natural Products from the Genus *Artemisia* L.”, Elsevier Science Publication, Amsterdam, n° 7, (1990), 201-264.
- [187] Giordani, R., Hadeif, Y., Kaloustian, J., “Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants”, *Phytothérapie*, n°79, (2008), 199.
- [188] Hudaib, M., Aburjai, T., “Composition of the essential oil from *Artemisia herba-alba* grown in Jordan”, *J. Essen. Oil. Res*, n°18, (2006), 301.
- [189] Bezza, L., Mannarino, A., Fattarsi, K., Mikail, C., Abou, L., Hadji-minaglou, F., Kaloustian, J., 2010 –« Composition chimique de l’huile essentielle d’*Artemisia herba-alba* provenant de la région de Biskra (Algérie) », *Phytothérapie*, n° 8, (2010), 277–281.
- [190] Vernin, G., Parkanyi, C., “GC/MS analysis of *Artemisia herba-alba* Asso from Algeria, Nonpolar and polar extracts”, *Riv. Ital. EPPOS*, n° 32, (2001), 3-16.
- [191] Vernin, G.O., Merad, G., Vernin, M., Zamkotsian, R.M., Parkanyi, C.D., “GC/MS analysis of *Artemisia herba-alba* Asso essential oils from Algeria”, *Develop. in food Sci.*, n° 37A, (1995), 147-205.

- [192] Jaime, A., Silvaa, T., Yonekurab, L., Kagandac, J., Mookdasanitd, J., Duong, T., Afacha, N.G., “Important Secondary Metabolites and Essential Oils of Species Within the Anthemideae (Asteraceae)”, *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, V. 11n° 1, (2005), 1-46
- [193] Kalembe, D., Kunicka, A., “Antibacterial and antifungal properties of essential oils”, *Current Medicinal Chemistry*, n° 10, (2003), 813-829.
- [194] Imelouane, B., El-Bachiri, A., Ankit, M., Khedid, K., Wathler, J.P., Amhamdi, H., “Essential oil composition and antimicrobial activity of *Artemisia herba-alba* Asso grow in Moricco”, (2010)
- [195] Sikkema, J., Bont, J.A.M., Poolman, B., “Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes”, *Journal of Biological Chemistry*, n° 269, (1994), 8022–8.
- [196] Helander, I.M., Alakomi, H.L., Kyosti, L.K., Mattiala-andholm, T., Pol, I., Smid, E.J., “Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria”, *J. Agric Food Chem*, n° 46, (1998), 3590–5.
- [198] Pichette, A., Larouche, P.L., Lebrun, M., Legault, J., “Composition and antibacterial activity of *Abies balsamea* essential oil”, *Phytother Res*, V. 20 n°5, (2006), 371–3.
- [199] Magwa, M.L., Gundidza, M., Gweru, N., Humphrey, G., “Chemical composition and biological activities of essential oil from the leaves of *Sesuvium portulacastrum*”, *J. Ethnopharmacol*; V. 103 n°1, (2006), 85–9.
- [200] Cha, J.D., Jeong, M.R., Jeong, S.I., Moon, S.E., Kil, B.S., Yun, S.I., “Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cryptomeria japonica*”, *Phytother Res*; V. 21 n°3, (2007), 295–9.
- [201] Takikawa, A., Abe, K., Yamamoto, M., Ishimaru, S., Yasui, M., Okubo, Y., “Antimicrobial activity of nutmeg against *Escherichia coli* O157”, *J Biosci Bioeng*, V. 94 n° 4, (2002), 315–20.
- [202] Franchomme, P., « L’aromatologie à visée anti-infectieuse », n°2, (1981), 25-47.
- [203] Koba, K., Sanda, K., Raynaud, C., Nenonene, Y.A., Millet, J., Chaumont, J.P., « Activités antimicrobiennes d’huiles essentielles de trois *Cymbopogon* sp. africains vis-à-vis de germes pathogènes d’animaux de compagnie », *Ann. Méd. Vét*, n° 148, (2004), 202-206.
- [204] Scora k, M., Scora, R.W., “Effect of volatiles on mycelium growth of *Penicillium digitatum*, *P. italicum*, and *P. ulaiense*”, *J. Basic Microbiol*, V. 38 n° 5, (1998), 405-413.
- [205] Kordali, S., Kotan, R., Mavi, A., Cakir, A., “Determination of the Chemical Composition and Antioxidant Activity of the Essential Oil of *Artemisia dracunculus* L. and of the Antifungal and Antibacterial Activities of Turkish *A. dracunculus*, *A. absinthium* and *santonium* Essential Oil”, *J. Agric. Food Chem.*, n° 53, (2005), 9452-9458.
- [206] Karmen, V., Bojana, B., Vrtacnik E., Pohleven F., “Effect of the antifungal activity of oxygenated aromatic essential oil compounds on the white-rot *Trametes versicolor* and the brown-rot *Coniophora puteana*”, *Int. Biodeterior. Biodegradation*, n° 51, (2003), 51-59.

- [207] Crespo, M.E., Jimenez, J., Gomis, E., Navarro C., “Antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus serpylloides* subspecies *gadorensis*”, *Microbios*, n° 61, (1990), 181-184.
- [208] Chebli, B., Achouri, M., Idrissi-Hassani, L.M., Hmamouchi, M., 2003 -Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers: *Fr. J. Ethnopharmacology*, 89, 165-169.
- [209] Chebli, B., Achouri, M., Idrissi-Hassani, L.M., Hmamouchi, M., “Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers”, *Fr. J. Ethnopharmacology*, n° 89, (2003), 165-169.
- [210] Derwich, E., Benziane, Z., Boukir, A., “GC/MS Analysis and Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Mentha Pulegium* Grown in Morocco”, *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, V. 6 n° 3, (2010), 191-198.
- [211] Gulluce, M., Sahin, F., Sokmen, M., Ozer, H., Daferera, D., Sokmen, A., Polissiou, M., Adiguzel, A., Ozkan, H., “Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *Longifolia*”, *Food Chemistry*, n° 103, (2007), 1449-1456.
- [212] Friedman, M., Buick, R., CHRISTOPHER, T., “Antimicrobial activities of plant compounds against antibiotic-resistant *Micrococcus luteus*”, *International Journal of Antimicrobial Agents*, V. 28 n° 2, (2006), 156-158.
- [213] Kabouchea, Z., Boutaghanea, N., Laggoune, S., Kabouche, A .A., Ait-kakib, Z., Benlabed, K., 2005 “Comparative antibacterial activity of five Lamiaceae essential oils from Algeria”, *International Journal of Aromatherapy*, V. 15 n° 3, (2005), 129-133.
- [214] Mercier, B., Prost, J., Prost, M., « L’huile essentielle de terebenthine et sa partie la plus volatile ( $\alpha$ - et  $\beta$ -pinènes) », une revue bibliographique. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, V. 22 n° 4, (2009), 331 – 342.
- [215] USAID : Agence Américaine pour le Développement International ., « Projet filière des plantes aromatique et médicinales du Maroc », (2006).

## APPENDICE A

### LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS

<i>A. herba alba</i>	<i>Artemisia herba Alba</i>
<i>A.campestris</i>	<i>Artemisia campestris</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
CMB	concentration minimale bactéricide
CMI	concentration minimale inhibitrice
CPG	chromatographie en phase gazeuse
D, Ø	Diamètre d'inhibition
DMSO	Diméthyle Sulfoxyde
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GC-MS	La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
GMH	Gélose Mueller Hinton
GN	Gélose nutritif
H.E	huile essentielle
<i>M. luteus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
Mg SO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	magnésium anhydre
Na Cl	chlorure de sodium
OTA	Ochratoxine A
RT	Temps de rétention
SM	spectrométrie de masse
UFC	Unité Formant une Colonie
UNESCO	Organisation des Nations unies pour l'éducation, la science et la culture
µg	Microgramme
µl	Microlitre
µm	Micromètre



## APPENDICE B

### COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE UTILISES

#### ➤ Gélose Mueller-Hinton

Composition en g/l :

Extrait de viande .....	3g
Hydrolysat acide de caséine.....	17,5 g
Amidon de maïs.....	1,5 g
Agar.....	17,0 g

PH = 7.4

Stérilisation à 121°C/15 mn.

Le milieu est livré prêt à l'emploi.

#### ➤ Gélose de Sabouraud Dextrose

Composition en g/l :

Digestion pancréatique de caséine.....	5.0 g
Digestion peptique de tissu animal.....	5.0 g
Dextrose.....	40.0 g
Gélose.....	15.0 g

PH = 6

Stérilisation à 121°C/15 mn.

Le milieu est livré prêt à l'emploi.

