

MA-540-175-1

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE SAAD DAHLAB, BLIDA 1  
FACULTE DES SCIENCES  
DEPARTEMENT DE CHIMIE



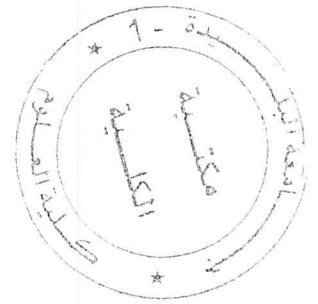
Laboratoire de chimie des produits naturels et de biomolécules (LCSN-BioM)

Mémoire présenté par

**Cherifi Amina  
&  
Aggouni Chahrazed**

**En vue d'obtenir le diplôme de Master**

Domaine : Science de la matière  
Filière : Chimie  
Spécialité : **Chimie des produits Naturels**



**Thème**

**Evaluation de l'activité antimicrobienne de deux espèces de la famille Lamiaceae - Etude de l'effet de synergie**

Soutenu publiquement le 10 juillet 2018 devant le jury composé de :

- |            |                   |                                  |
|------------|-------------------|----------------------------------|
| Président  | Monsieur A. Badis | Professeur en Université Blida 1 |
| Membre     | Madame N. Bouzidi | Docteur en Université Blida 1    |
| Promotrice | Madame O. Touafek | Docteur en Université Blida 1    |

**Promotion 2017-2018**

MA-540-175-1

# Remerciement

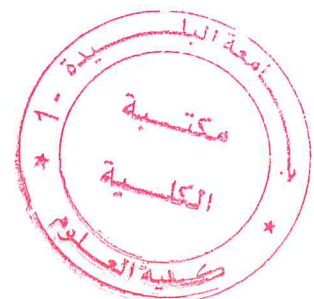
Avant tout nous remercions Dieu le tout puissant de nous avoir donnés le courage, la volonté, la patience et la santé durant toutes ces années et que grâce à lui ce travail a pu être réalisé.

Nos remerciements les plus vifs et chaleureux, vont à notre promotrice de mémoire Mme Touafek Ouassila, pour son aide, son orientation judicieuse et sa disponibilité, aussi pour la confiance, la patience et la compréhension qu'elle nos a toujours manifesté ...

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury d'avoir accepté de corriger et d'évaluer ce travail.

Nous voulons dire merci à tous les enseignants du département de chimie l'université de Blida pour l'aide pendant notre formation d'étude. A tous personnes qu'est aidé de proche ou loin

Enfin, on ne peut pas oublier de remercier nos familles, en particulier nos parents, pour leur compréhension, leurs sacrifices et leur patience.





# Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

Aux deux être le plus chers au monde, qui ont souffert nuit et jour pour nous  
couvrir de leur amour, mes parents.

A mon père « Mohamed » pour son patient avec moi et son encouragement.

A ma source de bonheur, la prunelle de mes yeux, ma mère « Ghania ». Que le  
bon ALLAH vous garde en bonne santé.

Je dédie aussi ce modeste travail : A ma sœur : Soumia

A mon très chers frères : Aymen

A mes grand-mères A mes oncles et mes tantes.

A chère doctorante « Chouit Hafsa » qui nos aide à terminer ce travail.

Ainsi que pour toutes mes amies surtout mon très chère "Asma" et ma chère  
binôme « Chahrazed » qui m'a accompagné toutes ces circonstances amour  
terme et de dévotion leur aidée et encouragée pendant cette Période de thèse.

A toute promotion chimie de produits naturels 2018.

A tous ceux que j'aime et que je respecte.

*Amína*

# Dédicace

Je remercie dieu tout puissant qui ma permet d'arriver à ce but.

Je dédié ce modeste travail à deux personnes les plus chers à mon cœur :

A mes très chers parents qui ont sacrifié de leur existante pour bâtir la mienne

Qui par leur précieux conseils et contient ont sa me guider ver la voix de la  
réussite.

A mes chères sœurs : *Yasmina, Manelle, Nadjela*

A mes chers frères: *Mohamed, Ahmed, Mustapha*

A monsieur *Feroukhi Abdellah* pour nous fournir la plante *R. officinalis* pour  
ce travail.

A mes chères amies : *Iméne, Zahra, Dalal, Nawel, Salima, Wafa, Amina,*

*Fatima, Safia* pour leur aidée et encouragée pendant cette

Période de thèse.

Et à tous mes amis que je n'ai pas mentionnés.

A chère doctorante *Chouit Hafsa* qui nos aide à terminer ce travail.

A tous ceux que j'aime et que je respecte.

Chahrazed

## Résumé

Le présent travail a été consacré, d'une part, à l'extraction de métabolites secondaires, par hydrodistillation pour les huiles essentielles et par macération dans l'éthanol à froid pour les extraits, de deux espèces de la famille Lamiaceae, récoltées à Chréa dans la région de Blida en avril 2018; *Salvia officinalis* et *Rosmarinus officinalis*. Et d'autre part, à l'étude de leurs activités antimicrobiennes vis-à-vis dix souches bactériennes et deux souches fongiques, ainsi que l'évaluation de l'effet de l'association des deux huiles essentielles et de deux extraits.

L'analyse GC et GC/MS de l'huile essentielle de l'espèce *Salvia officinalis* a montré que cette huile est majoritairement composée de Gurjunene (20.29%) et biformene (19.59%), et l'analyse de l'huile essentielle de l'espèce *Rosmarinus officinalis* a présentée ces composés majoritaires camphre (15.69%), 1.8-cineol (15.42%), borneol (11.15%),  $\alpha$ -pinène (8.53%) et verbenone (7.19%).

Les résultats de l'activité antimicrobienne ont montrés que les huiles essentielles et les extraits ont une activité puissante vis-à-vis les bactéries à gram positive et les levures mais, une faible activité vis-à-vis les bactéries à gram négative.

En fin, nous avons pu montrer que l'association des deux huiles essentielles et des deux extraits éthanoliques de ces deux plantes permettaient de réduire considérablement les CMI et donc de potentialiser leur activité antibactérienne.

**Mots clés :** *Salvia officinalis*, *Rosmarinus officinalis*, Huile essentielle, Activité antimicrobienne, GC/MS, Synergie.



## Abstract

The present work aims, on the one hand, to the extraction of secondary metabolites, by hydrodistillation for essential oil and by maceration in cold ethanol for extracts of two plants *Salvia officinalis* and *Rosmarinus officinalis*, that belongs to the family of Lamiaceae. These species were collected, in April 2018, from Chr ea in the region of Blida. On the other hand, to study of their antimicrobial activities against ten bacterial strains and two fungal strains, as well as the evaluation of the effect of the combination of the two essential oils and two extracts.

The GC and GC/MS analysis of essential oil of the species; *Salvia officinalis* and *Rosmarinus officinalis* showed that the first oil mainly consists of Gurjunene (20.29%) and Biformene (19.59%), while the major components of the second oil are mainly, camphor (15.69%), 1,8-cineol (15.42%), borneol (11.15%),  $\alpha$ -pinene (8.53%) and verbenone (7.19%).

The results of the antimicrobial activity have shown that the essential oils and extracts have a potent activity against gram-positive bacterial strains and fungal strains but a low activity against gram-negative bacterial strains.

The synergetic antimicrobial effect between the two essential oils of these two plants and the two ethanolic extracts was also demonstrated.

**Key words:** *Salvia officinalis*, *Rosmarinus officinalis*, Essential oil, Antimicrobial activity, GC/MS, Antimicrobial synergy.

## ملخص

تم تكريس هذا العمل ، من جهة ، لاستخراج الأيضات الثانوية ، عن طريق التقطير البخار للزيوت الطيارة والتشتيل في الإيثانول البارد لنبتتين تنتميان الى عائلة الشفويات (Lamiaceae) من منطقة الشريعة بالبلدية في أفريل 2018، *Rosmarinus officinalis* و *Salvia officinalis* ومن جهة اخرى لدراسة أنشطتها المضادة للميكروبات باستعمال عشر سلالات بكتيرية وسلالتين فطريتين، وكذلك تقييم التأثير التازري لمزيج الزيوت العطرية وكذا المستخلصات. أظهر التحليل GC / MS للزيوت العطرية لنبتتين *Rosmarinus officinalis* و *Salvia officinalis* ان الاولى تتكون أساسا من (20.29) Gurjunene و (19.59) biformene، و ان الزيت العطري للثانية تتكون اساسا من الكافور (15.69%) (1.8 سينيول (15.42%)، بورنيول (11.15%) بينين (8.53%) و فيريبيون (7.19%). وقد أظهرت نتائج النشاط البكتيري أن الزيوت الأساسية والمستخلصات لديها نشاط قوي ضد البكتيريا غرام ايجابي والخمائر ولكن منخفضة ضد البكتيريا غرام سلبي. في الاخير أظهرت النتائج المتحصل عليها من دراسة التأثير التازري للزيوت العطرية لنبتتين المدروستين و كذلك للمستخلصات الإيثانولية ان هذا الجمع يسمح بتقليل إلى حد كبير من CMI وتحفيز نشاطهم ضد البكتيريا.

كلمات مفتاحية : *Rosmarinus officinalis* ، *Salvia officinalis* ، النشاط المضادة للميكروبات زيت عطري ، الفعل التازري، GC / MS .

# Liste des abréviations

<b>CG/MS</b>	Chromatographie en phase gazeuse coupée au spectromètre de masse
<b>CMI</b>	Concentration minimale inhibitrice
<b>CMB</b>	Concentration minimale bactéricide
<b>FIC</b>	Fraction de concentration inhibitrice
<b>DMSO</b>	Diméthyl sulfoxyde
<b>HLS</b>	Homosérine lactane
<b>CTR</b>	ceftriaxone
<b>HE</b>	Huile essentiel
<b>EE</b>	Extrait ethanolique



# Liste des figures

<b>Figure 1 :</b>	La sauge officinalis ( <i>Salvia officinalis</i> ).....	6
<b>Figure 2 :</b>	<i>Rosmarinus officinalis</i> (romarin).....	12
<b>Figure 3 :</b>	Mode d'action des antibiotiques.....	20
<b>Figure 4 :</b>	Feuilles séchées de <i>S.officinalis</i> (a) et <i>R.officinalis</i> (b).....	27
<b>Figure 5 :</b>	Montage de l'hydrodistillation par clewenger.....	28
<b>Figure 6 :</b>	Protocole d'extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation ....	29
<b>Figure 7 :</b>	Macération du matériel végétale.....	33
<b>Figure 8 :</b>	Protocole d'extraction par macération.....	33
<b>Figure 9 :</b>	Méthode de diffusion sur disque.....	34
<b>Figure 10 :</b>	Repiquage des souches.....	35
<b>Figure 11:</b>	Ecoulement du milieu de culture.....	35
<b>Figure 12:</b>	Ensemencement microbienne.....	43
<b>Figure 13 :</b>	Dépôt des disques.....	45
<b>Figure 14 :</b>	Profil chromatographique d'analyse de l'huile essentielle de <i>Salvia officinalis</i> .....	47
<b>Figure 15 :</b>	Profil chromatographique d'analyse de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	49
<b>Figure 16 :</b>	Les diamètres de la zone d'inhibition des huiles essentielles relatives aux différentes souches microbiennes	50

# Liste des tableaux

<b>Tableau : 1</b>	Propriétés biologiques de quelques espèces du genre <i>Salvia</i> .....	5
<b>Tableau : 2</b>	Les principaux métabolites secondaires isolés de l'espèce <i>Salvia officinalis</i> .....	7
<b>Tableau : 3</b>	La composition chimique (>3%) de l'huile essentiel de l'espèce <i>S. officinalis</i> récoltée de différentes régions.....	10
<b>Tableau : 4</b>	La composition chimique (>3%) de l'huile essentiel de l'espèce <i>R. officinalis</i> récoltée de différentes régions.....	16
<b>Tableau : 5</b>	Souches microbiennes utilisées.....	32
<b>Tableau : 6</b>	La série de dilution d'huiles essentielles de <i>Salvia officinalis</i> et du <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	38
<b>Tableau : 7</b>	La série de dilution des extraits éthanoliqesde <i>Salvia officinalis</i> et du <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	39
<b>Tableau : 8</b>	Masses et rendements d'huiles essentielles et d'extraits de <i>S. officinalis</i> et <i>R. officinalis</i> .....	41
<b>Tableau : 9</b>	Caractéristiques organoleptiques d'huiles essentielles et d'extraits de <i>S. officinalis</i> et <i>R. officinalis</i> .....	41
<b>Tableau : 10</b>	Composition de l'huile essentielle du <i>Salvia officinalis</i> .....	42
<b>Tableau : 11</b>	Composition de l'huile essentielle du <i>Rosmarinus officinalis</i> ...	44
<b>Tableau : 12</b>	Les résultats de l'aromatogramme des huiles essentielles des deux espèces étudiées <i>S.officinalis</i> et <i>R.officinalis</i> .....	46
<b>Tableau : 13</b>	Les résultats de l'aromatogramme de l'extrait éthanolique de l'espèce <i>Salvia officinalis</i> .....	48
<b>Tableau : 14</b>	Les résultats de l'aromatogramme de l'extrait éthanolique de l'espèce <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	49
<b>Tableau : 15</b>	Les résultats de l'aromatogramme des antibiotiques références .....	51
<b>Tableau : 16</b>	Concentrations minimales inhibitrices de l'huile essentielle de l'espèce <i>S. Officinalis</i>	52
<b>Tableau : 17</b>	Concentrations minimales inhibitrices de l'huile essentielle de l'espèce <i>R. Officinalis</i> .	53

<b>Tableau : 18</b>	Concentrations minimales inhibitrices de l'extrait ethanolique de l'espèce <i>S. Officinalis</i> .....	53
<b>Tableau : 19</b>	Concentrations minimales inhibitrices de l'extrait ethanolique de l'espèce <i>S. Officinalis</i> de la souche bacterienne <i>Escherichia coli</i> .....	54
<b>Tableau : 20</b>	Concentrations minimales inhibitrices de l'extrait ethanolique de l'espèce <i>R. Officinalis</i> .....	54
<b>Tableau : 21</b>	Concentrations minimales inhibitrices de l'extrait ethanolique de l'espèce <i>R. Officinalis</i> de la souche bacterienne <i>Escherichia coli</i> .....	54
<b>Tableau : 22</b>	Résultat de l'association de deux huiles essentielles de <i>S. officinalis</i> et <i>R. officinalis</i> .....	55
<b>Tableau : 23</b>	Résultat de l'association de deux extraits éthanoliques de <i>S. officinalis</i> et <i>R. officinalis</i> .....	56



# Sommaire

Remerciement

Dédicace

Résumé

Liste des tableaux

**Introduction générale**

## Partie théorique

### Chapitre 1 : Aperçu bibliographique sur les plantes étudiées

<b>I-1- Présentation de la famille Lamiaceae .....</b>	<b>3</b>
I -2-Présentation du genre <i>Salvia</i> .....	3
I-2-1-Description botanique.....	3
I-2-2- Répartition géographique .....	4
I-2-3-Utilisation dans la médecine traditionnelle.....	4
I-2-4-Les propriétés biologiques de quelques espèces.....	4
I-3-Présentation de l'espèce <i>Salvia officinalis</i> .....	5
I -3-1-Description botanique.....	5
I-3-2- Systématique botanique.....	6
I-3-3- Répartition géographique.....	6
I-3-4-Utilisation dans la médecine traditionnelle .....	7
I-3-5- Propriétés biologiques de l'espèce <i>Salvia officinalis</i> .....	7
I-3-6- Etude antérieurs sur les principaux métabolites secondaires de l'espèce <i>Salvia officinalis</i> .....	7
I-3-7- Etude antérieur sur la composition chimique de l'huile essentielle de l'espèce <i>Salvia officinalis</i> .....	9
<b>I.4.Présentation du genre <i>Rosmarinus</i> .....</b>	<b>11</b>
I.4.1.Description botanique .....	11

I.4.2.Répartition géographique.....	11
I.4.3.Utilisation dans la médecine traditionnelle .....	11
I.4.4. Propriétés biologiques.....	12
<b>I.5.Présentation de l'espèce <i>Rosmarinus officinalis</i>.....</b>	<b>12</b>
I.5.1. Description botanique.....	12
I.5.2.Systématique botanique.....	12
I.5.3.Répartition géographique .....	13
I.5.4.Utilisation dans la médecine traditionnelle .....	13
I.5.5.Propriétés biologiques de l'espèce <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	13
I.5.6. Etude antérieure sur les principaux métabolites secondaires de l'espèce <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	13
I.5.7.Etude antérieure sur la composition chimique de l'huile essentielle de l'espèce <i>R.officinalis</i> .....	15

## **Chapitre 2 : Généralité sur l'activité antimicrobienne**

<b>II.1.Définition de l'activité antimicrobienne.....</b>	<b>19</b>
I.4.Microorganisme .....	19
I.3.Souches.....	19
<b>II.4. Antibiotiques.....</b>	<b>19</b>
II.4.1. Définition .....	19
II.4.2. Modes d'action des antibiotiques .....	20
<b>I.5. La CMI et la CMB.....</b>	<b>20</b>
<b>II.6.L'activité antimicrobienne des huiles essentielles.....</b>	<b>21</b>
II.6.1. Activité liée à la composition chimique.....	21
II.6.2.Activité liée au microorganisme.....	21
<b>II.7. Association des antibiotiques .....</b>	<b>22</b>
<b>II.8.Effets d'association des antibiotiques.....</b>	<b>22</b>
<b>II.9.Méthodes utilisées dans l'association des antibiotiques.....</b>	<b>22</b>
II.9.1.Méthode en point fixé.....	23
II.9.2. Méthode en cinétique .....	23

## **Partie expérimentale**

### **Chapitre 1 : Aperçu bibliographique sur les plantes étudiées**

<b>I.1. Matériel végétal.....</b>	<b>27</b>
<b>I.2. Extraction de l'huile essentielle et préparation des extraits de l'espèce <i>Salvia officinalis</i> et <i>Rosmarinus officinalis</i>.....</b>	<b>27</b>
I.2.1. Extraction de l'huile essentielle par Hydrodistillation.....	27
I.2.2. Préparation des extraits par macération .....	29
I.2.3. Calcul du rendement .....	30
<b>I.3. Analyse des huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS).....</b>	<b>30</b>
<b>I.4. Souches microbiennes utilisées.....</b>	<b>31</b>
<b>I.5. Evaluation de l'activité antimicrobienne.....</b>	<b>32</b>
I.5.1. La méthode des disques.....	32
I.5.2. La méthode des puits.....	36
<b>I.6. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....</b>	<b>36</b>
I.6.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice en milieu liquide.....	36
I.6.2. Détermination de la CMI par la méthode de diffusion sur gélose.....	37
I.7. Détermination de l'effet d'association antimicrobienne .....	39

## **CHAPITRE 2 : Résultats et discussions**

<b>II.1. Résultats de l'extraction .....</b>	<b>41</b>
II.1.1. Calcul des rendements.....	41
II.1.2. Caractéristiques organoleptiques .....	41
<b>II.2. analyse GC-MS des huiles essentielles .....</b>	<b>42</b>
<b>II.3. Etude de l'activité antimicrobienne par la méthode de l'aromatogramme.....</b>	<b>46</b>
<b>I.4. Concentration minimale inhibitrice .....</b>	<b>52</b>
<b>I.5. Evaluation de l'association des deux huiles essentielles et des deux extraits ethanoliqes de <i>S. officinalis</i> et <i>R. officinalis</i> .....</b>	<b>55</b>
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>58</b>



## Introduction générale

Depuis des milliers d'années, l'humanité a utilisé diverses plantes trouvées dans son environnement, afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies, ces plantes représentent un réservoir immense de composés potentiels attribués aux métabolites secondaires qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structure chimique et ils possèdent un très large éventail d'activités biologiques. Cependant l'évaluation de ces activités demeure une tâche très intéressante qui peut faire l'intérêt de nombreuses études.

Le continent africain est doté d'une biodiversité parmi les plantes riches dans le monde, avec un nombre très élevé de plantes utilisées comme herbes, comme aliments naturels et pour des buts thérapeutiques. De nombreuses substances naturelles différentes ont été identifiées et beaucoup d'entre elles se sont utilisées dans la médecine traditionnelle pour la prophylaxie et le traitement des maladies.

Actuellement, le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques et à la toxicité des produits de synthèse sont conduit les chercheurs à puiser dans le monde végétal et particulièrement les plantes médicinales et culinaires en quête de molécules naturelles efficaces et dénuées de tout effet adverse.

Dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales, notre choix s'est porté sur deux plantes, très répandues en Algérie à chréa dans la région de Blida, qui appartiennent à la famille des Lamiaceae : *Salvia officinalis* et *Rosmarinus officinalis*.

Le présent travail a pour objectif l'étude de l'activité antimicrobienne d'huiles essentielles et d'extraits de ces deux espèces, ainsi que l'étude de l'effet de synergie. Il est subdivisé en deux parties.

La partie théorique contient deux chapitres, le premier renferme une étude bibliographique sur les deux plantes étudiées. Le deuxième contient une généralité sur l'activité antimicrobienne.

La deuxième partie est scindée également en deux chapitres, le premier est consacré à la description des travaux effectués au laboratoire, tandis que le deuxième renferme la discussion des résultats obtenus.

On finalise ce travail par une conclusion générale.

**Synthèse**  
**bibliographique**

# **Chapitre 1 : Aperçu bibliographique sur les plantes étudiées**

## **I-1- Présentation de la famille Lamiaceae**

La famille des Lamiacées (Lamiaceae ou Labiateae) est une famille botanique très large. La majorité de ces espèces ont une grande importance, vu leurs valeurs économiques [1]. Elle est l'une des familles les plus utilisées comme source mondiale d'épices et d'extrait à fort pouvoir antimicrobien, antifongique, anti-inflammatoire et antioxydant [2]. Cette famille est très diversifiée avec 250 genres et environ 6970 espèces [3], elle se caractérise par la présence des huiles essentielles.

Les labiées sont des herbes, arbustes et arbres, à tiges quadrangulaires et à inflorescences verticillées. Les Feuilles sont souvent lancéolées, et dentées. Les Fleurs sont à symétrie bilatérale, à deux lèvres. Les feuilles sont opposées-décussées, ils sont regroupées en glomérules. L'ovaire est divisé en quatre au fond du calice (2 carpelles soudés, secondairement divisés) [4].

Du point de vue chimique, cette famille a fait l'objet d'intenses investigations dans le but d'isoler différents types de composés. Parmi les genres qui sont en cause, on cite : *Ajuga*, *Rhabdosia*, *Teucrium*, *Salvia*, *Scutellaria*, *Stachys*, *Leonurus*, *Rosmarinus*, *Thymus* et *Phlomis*. Ces études ont permis d'isoler un grand nombre de métabolites secondaires tels que les stérols, les flavonoïdes, les iridoïdes, les sesquiterpènes, les diterpènes et les triterpènes [5].

Les Lamiacées sont rencontrées sous tous les climats, à toutes les altitudes. Certains des 250 genres que compte cette famille sont quasiment cosmopolites, d'autres ont une distribution plus restreinte. Rare dans le milieu forestier tropical. Les Lamiacées se concentrent dans la région méditerranéenne [6].

## **I -2-Présentation du genre *Salvia***

### **I-2-1-Description botanique**

Le genre *Salvia* est un des genres les plus importants de la famille Lamiacée, il rassemble plus de 959 espèces [7].

Le nom vernaculaire « sauge » est attribué aux différentes espèces aromatiques du genre *Salvia* [8]. Le nom scientifique de la sauge indique clairement l'importance de son rôle en phytothérapie : *Salvia* vient de « Salvare » qui, en latin, signifie « sauver » [5], ce nom est corrompu populairement en « Sauja » et « Sauge » en Français et « Sawge » en ancien anglais.

Le genre *Salvia* comprend des espèces annuelles, bisannuelles ou vivaces. Les tiges sont généralement quadrangulaires inclinées comme les autres membres de la famille des



lamiacées. Les feuilles sont généralement entières, mais parfois dentées ou pennées. Les hampes florales portent de petites bractées inégales [9].

### **I-2-2- Répartition géographique**

Le genre *salvia* représente une gamme remarquable de variation des espèces [10], ce genre se propage dans le monde entier: Amérique centrale et latine, en Asie centrale et dans la région méditerranéenne, et en Afrique du Sud [11].

En Algérie, 18 espèces du genre *salvia* ont été répertoriés: *S. Balansae* de Noé ; *S. officinalis* L ; *S. Chudaei* Batt et Trab. ; *S. triloba* L. fils ; *S. lavandulaefolia* Vahl ; *S. Aucheri* Benth. ; *S. phlomoides* Asso ; *S. Jaminiana* de Noé ; *S. verbenaca* (L.) Briq. ; *S. Horminum* L. ; *S. aegyptiaca* L. ; *S. silvestris* L. ; *S. tingitana* Ette. ; *S. Sclarea* L. ; *S. Æthiopis* L. ; *S.algeriensis* Desf. ; *S. Barrelieri* Ettlign et *S. argentea* L.[4].

### **I-2-3-Utilisation dans la médecine traditionnelle**

Le genre *Salvia* est très connu en pharmacopée traditionnelle à cause de ses divers avantages pour le corps humain, ses plantes sont utilisées pour :

- Régularise le cycle menstruel, la transpiration, les bouffées de chaleur et les modifications hormonales [12].
- le traitement de la diarrhée [13].
- le traitement de les troubles urinaires et pour les pieux et les douleurs de l'estomac [13].
- Le traitement de certains des maladies comme le rhume, la bronchite, les douleurs, les infections et l'hémorragie [14].
- Le traitement les infections microbiennes, les symptômes associés aux cancers et les maladies des yeux [15].

### **I-2-4-Les propriétés biologiques de quelques espèces**

Le genre *salvia* possède des propriétés biologiques très importantes. En corrélation avec ces différents usages traditionnels. Diverses études ont été menées afin de confirmer les différents effets thérapeutiques, tel que les effets; anti-inflammatoire, antiseptique, antioxydant, antidiabétique, antibactérien, anti-tumorale, antispasmodique et l'utilisation dans la conservation des denrées traditionnelles.

Le tableau suivant représente les propriétés biologiques de quelques espèces de ce genre :

**Tableau 1 : Propriétés biologiques de quelques espèces du genre *Salvia***

Espèce	Propriétés	Référence
<i>S. scarea</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Traitements des maux des yeux.</li> <li>• Insecticide</li> </ul>	[16]
<i>S. hydrangea</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Antibactérienne</li> <li>• Antifongique</li> <li>• Insecticide</li> </ul>	[17]
<i>S. fruticosa</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• effet antidiabétique et anti-inflammatoire.</li> <li>• Utilisation contre l'hépatite et la tuberculose</li> </ul>	[18]
<i>S. divinorum</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La feuille peut être appliquée sur le front du patient comme un cataplasme</li> <li>• Utilisée comme : diurétique, contre la diarrhée, l'anémie, les rhumatismes et les maux de tête</li> </ul>	[19]
<i>S. barrelieri</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Utilisée contre les rhumatismes et pour soulager les ulcères d'estomac.</li> </ul>	[20]
<i>S. pratensis</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Antimicrobienne</li> <li>• Antioxydante</li> </ul>	[21]

### **I -3-Présentation de l'espèce *Salvia officinalis***

#### **I -3-1-Description botanique**

La Saugue officinale est une plante très ramifiée pouvant atteindre 50 à 80 cm de haut, avec une tige carrée caractéristique des Lamiacées, à la base lignifiée. Ses feuilles sont opposées, oblongues, veloutées, rugueuses au toucher, à bords très finement denticulés, aux multiples nervures qui sont saillantes sur la face inférieure, de couleur vert pâle, légèrement gris-blanchâtre. Les jolies fleurs bleues ou roses en épis font leur apparition vers le mois de mai et restent ouvertes le temps d'un été [22].



Figure 1 : La sauge officinale (*salvia officinalis*)

### I-3-2- Systématique botanique

La sauge suit la classification suivante [23]:

- Règne : Planteae (végétal)
- Embranchement : Cormophytes
- Sous embranchement : Angiospermes
- Classe : Magnoliopsida
- Sous classe : Asteridae
- Ordre : Lamiales
- Famille : Lamiaceae
- Genre : *Salvia*
- Espèce : *Salvia officinalis* L

**Nom scientifique :** *Salvia officinalis* L.

**Nom commun :** Souak en anabi (Arabe), Saugue officinale (français), Agourim Imeksaouen, Tazzourt, Marramia(Berbère).

### I-3-3- Répartition géographique

*Salvia officinalis* est une plante vivace, elle est originaire des régions méditerranéennes orientales. Cette plante préfère les terrains chauds et calcaires. Elle croit de manière spontanée et en culture tout au long de tout le bassin méditerranéen, de l'Espagne jusqu'à la Turquie, et dans le nord de l'Afrique [24].



### I-3-4- Utilisation dans la médecine traditionnelle

*Salvia officinalis* est une des plantes médicinales et aromatiques les importantes, elle est largement connue en médecine traditionnelle comme ;

- Un bon traitement pour les infections respiratoires et les affections telles que l'asthme [24].
- Elle est considérée comme un bon stimulant pour les gens anémiques.
- Elle est appliquée en gargarisme contre les inflammations de la bouche et les abcès [24].
- Elle est utilisée pour le nettoyage et la cicatrisation des plaies [24].
- Les infusions de la sauge sont appliquées pour le traitement de la circulation sanguine, les troubles digestifs et les problèmes du système nerveux [25].

### I-3-5- Propriétés biologiques de l'espèce *Salvia officinalis*

Le nom scientifique de la sauge indique clairement l'importance de son rôle, Elle se caractérise par ses plusieurs effets thérapeutiques dus à son huile essentielle. Sa saveur est chaude, amère et astringente, elle agit contre les maux de gorge, les troubles de la digestion, elle est stimulante, tonique et stomachique. La sauge possède aussi à divers degrés des propriétés antispasmodiques, fébrifuges, antisudorales et emménagogues (action bénéfique sur les menstruations) [26]. Elle a une activité tranquillisante (calmer les crises de l'Alzheimer) [27].

Les feuilles de la sauge (*S. officinalis*), montrent une gamme des activités biologiques; antibactérienne, antifongique, antivirale et astringente [28].

### I-3-6- Etude antérieurs sur les principaux métabolites secondaires de l'espèce *Salvia officinalis*

Les principaux métabolites secondaires isolés de l'espèce *Salvia officinalis* sont les monoterpènes, les diterpénoïdes, les sesquiterpénoïdes, les flavonoïdes, et les polyphénols.

**Tableau 2** : Les principaux métabolites secondaires isolés de l'espèce *Salvia officinalis*.

Métabolites secondaires			références
	Monoterpènes	acycliques	Myrcène
		monocycliques	Cinéol



<b>Terpénoides</b>		<b>bicycliques</b>	$\alpha$ -pinène $\beta$ -pinène Camphène Thujone Camphre Bornéol Acétate de bornyl	[29]
	<b>Sesquiterpènes</b>	<b>monocycliques</b>	Humulène	
		<b>bicycliques</b>	Caryophylène	
	<b>Diterpènes</b>	<b>Bicycliques</b>	manool	[30]
		<b>Tricycliques</b>	Acide carnosique Acide 12-méthoxy- carnosique 12-méthoxycarnosol Galdosol Rosmanol Atuntzensine	[31]
<b>Poly-phénols</b>	Acide rosmarinique [32] Acide 4-hydroxybenzouique [33] Acide caféique [33] Acide férulique [34] Acide salvianolique L [35] 6-féulolyl- $\alpha$ -glucose [36]			
<b>Flavonoïdes</b>	<b>Flavonoïdes glucosides</b>	7-glucosyl apigénine (cosmosiine)	[37]	
		6-hydroxy-6-méthoxy-7-glucosylapigénine	[34]	
		6-hydroxy-7-glucosyl lutéoline	[38]	
	<b>Flavonoïdes aglycones</b>	5, 7,4' -trihydroxyflavone 5,4'-dihydroxy-7-méthoxyflavone (genkwanine)	[34]	

### **I-3-7- Etude antérieure sur la composition chimique de l'huile essentielle de l'espèce *Salvia officinalis***

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes de substances organiques aromatiques liquides, qu'on trouve naturellement dans diverses parties des végétaux. Elles sont très concentrées, volatiles et sensibles à la décomposition sous l'effet de la chaleur. La définition récente de l'huile essentielle est : « un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par hydro distillation » [39]. La composition chimique d'une huile essentielle de la plante *salvia officinalis* peut varier à l'intérieur d'une même espèce

Le tableau suivant rassemble les composés chimiques majoritaires (supérieur à 3%) présents dans des huiles essentielles de l'espèce *salvia officinalis* récoltées dans des régions différentes.

**Tableau 3 :** La composition chimique (>3%) de l'huile essentielle de l'espèce *S. officinalis* récoltée de différentes régions

composé	Serbie [40]	Portugal [41]	Monténégro [40]	Bulgarie [42]	Italie [43]	Maroc [29]	Tunisie [44]	Algérie [45, 46]	
								(TiziOuzou)	(Batna)
$\alpha$ -pinène	3.02	4.22	4.58	5.10	-	3.8	-	2.05	-
Camphène	5.28	-	3.47	3.60	-	2.2	-	4.14	-
$\beta$ -pinène	-	-	-	-	7.22	5.04	5.19	-	-
1,8-cinéol	6.35	6.47	12	12.5	7.73	5.27	16.96	-	15.92
Myrcène	-	-	-	-	-	3.07	-	2.16	-
$\alpha$ -thujone	19.90	25.5	8.47	29.40	39.32	-	26.45	-	26.49
$\beta$ -thujone	3.79	3.89	-	17.40	3.07	-	11.55	-	6.50
camphre	24.8	19.51	7.62	11.70	-	5.87	3.38	-	16.86
borneol	5.4	-	8.50	-	-	3.34	-	1.4	-
Acétate de bornyl	4.91	-	-	-	-	3.36	-	-	-
(E)- $\alpha$ -caryophyllène	-	3.17	-	-	-	4.54	-	-	-
(E)- $\beta$ -caryophyllène	-	-	-	-	9.05	-	9.04	-	-
$\alpha$ -humulène	3.97	7.46	5.94	2.9	12.42	3.64	-	-	-
viridiflorol	-	6.29	-	-	-	4.16	-	-	6.35
azulène	-	-	-	-	-	-	-	30.6	-
sabinène	-	-	-	-	-	-	-	7.8	-



D'après cette étude bibliographique, on remarque que l'huile essentielle de *S. officinalis* est très riche en monoterpènes, dont le composé majoritaire dans l'huile essentielle de l'espèce récoltée en Batna (Algérie), Tunisie, Italie, Bulgarie, Portugal est l' $\alpha$ -thujone avec un pourcentage de 16.86 %, 26.45%, 39.32%, 29.40%, 25.5% respectivement, en Maroc et Serbie est le camphre 5.87%, 24.8%, en Monténégro est le 1,8-cinéol 12% et en tizi-ouzou (Algérie) est l'azulène 30.6%.

Cette variation peut être due à de nombreux facteurs comme exemple l'origine botanique, l'origine géographique...

#### **I.4.Présentation du genre *Rosmarinus***

##### **I.4.1.Description botanique**

Les espèces du genre *Rosmarinus* sont des arbustes ou sous arbrisseaux ligneux très odorants. Les feuilles sont linéaires à marge révoluée, gaufrées, verdâtres, en dessus, plus ou moins hispides, blanchâtres en dessous. Le calice en cloche, bilabié. La corolle est bleu pâle ou blanchâtre à deux lèvres, la supérieure entière ou à peine marginée n'est pas plus longue que l'inférieure. Cette dernière est très lobée [47].

##### **I.4.2.Répartition géographique**

Les espèces du genre *Rosmarinus* sont originaires du bassin méditerranées poussent spontanément dans le Sud de l'Europe. Elles apprécient les climats chauds, modérément secs, les branches récoltées pendant l'été sont séchées à l'air et à l'ombre [48].

Le genre *Rosmarinus* regroupe deux espèces de plantes arbrisseaux et aromatiques de la famille des Lamiacées [49]. Les deux espèces sont *Rosmarinus eriocalyx* Jord & Fourr et *Rosmarinus officinalis* elles sont cultivées dans le monde entier à partir de semis ou de boutures au printemps.

##### **I.4.3.Utilisation dans la médecine traditionnelle**

Le genre *Rosmarinus* a été utilisé dans la médecine traditionnelle depuis l'antiquité, ses parties aériennes sont utilisées, par voie orale, pour soulager la colique rénale, les dysménorrhées et comme antispasmodique [50].

Le décocté des feuilles est prescrit pour l'hypotension artérielle, cependant, sa poudre végétale est utilisée pour traiter la diarrhée. En plus, le décocté de la partie aérienne est préconisé pour : les douleurs abdominales, les troubles hépatiques, la dyspepsie intestinale, les gaz, les migraines, les rhumatismes, la peau et l'affections des cheveux [51].

L'huile de *Rosmarin* est très connue pour calmer les douleurs, comme les douleurs musculaires rhumatismales et traumatiques [52].



#### I.4.4. Propriétés biologiques

Le genre *Rosmarinus* possède des propriétés biologiques très importantes. En corrélation avec ces différents usages traditionnels. Diverses études ont été menées afin de confirmer les différents effets thérapeutiques, tel que les activités; antitussive, antivirale contre le virus du sida (VIH) [53], antiasthmatique, anti-paralytique et l'utilisation dans la conservation des denrées traditionnelles.

#### I.5. Présentation de l'espèce *Rosmarinus officinalis*

##### I.5.1. Description botanique

Le *Romarin* est un arbrisseau de la famille des labiées, peut atteindre jusqu'à 1,5 m de hauteur, il est facilement reconnaissable en toute saison à ses feuilles persistantes sans pétiole, coriaces beaucoup plus longues que larges, aux bords légèrement enroulés, vert sombre luisant sur le dessus, blanchâtres en dessous. La floraison commence dès le mois de février (ou janvier parfois) et se poursuit jusqu'au avril – mai. La couleur des fleurs varie du bleu pâle au violet (plus rarement la variété à fleurs blanches *Rosmarinus officinalis albiflorus*). Le calice velu à dents bordées de blanc, elles portent deux étamines ayant une petite dent vers leur base. Comme pour la plupart des Lamiacées, le fruit est un tetrakène (de couleur brune) [54].



Figure 2 : *Rosmarinus officinalis* (*Romarin*)

##### I.5.2. Systématique botanique

La classification dans la systématique botanique du *Romarin* est la suivante [55] :

- Règne : Plantae
- Division : Magnoliophyta
- Classe : Magnoliopsida
- Ordre : Lamiales
- Famille: Lamiacées
- Genre : *Rosmarinus*
- Espèce : *Rosmarinus officinalis*

## Noms vernaculaires

-**En Français** : romarin officinal, herbe aux couronnes, herbe aux troubadours, encensier, arbre de Marie, rose de mer, rose des marins, roumaniou en provençal [56]

-**En Arabe**: Iklil Al Jabal, Klil [57].

### I.5.3.Répartition géographique

Le *Romarin* se trouve dans toutes les contrées mondiales de l'Europe, plus particulièrement sur le pourtour méditerranéen, de préférence dans les lieux secs et arides, exposés au soleil, à l'état sauvage, il se trouve sur des sols calcaires [58].

### I.5.4.Utilisation dans la médecine traditionnelle

Le *Romarin* est originaire du bassin méditerranéen. Depuis l'antiquité, il est employé pour améliorer et stimuler la mémoire.

Il est en effet considéré comme une plante tonique, revigorante, stimulante : autant de vertus que reflète sa saveur aromatique bien particulière. Il agit sur le système nerveux central comme stimulant. Pour usage externe, comme cicatrisant. L'infusion des feuilles ont plusieurs actions physiologiques : stimulant générale, cholagogue, antiseptique, diurétique, emménagogue. Le *Romarin* stimule la circulation cérébrale, améliorant concentration et mémoire. Il soulage également céphalées et migraines. Il favorise la pousse des cheveux en stimulant l'irrigation du cuir chevelu [59]. Il est considérée utile pour contrôler l'érosion du sol [50]. L'huile essentielle du romarin a été largement répandue pendant des siècles, comme un des ingrédients en produits de beauté, savons, aussi bien pour l'assaisonnement et la conservation des produits alimentaires [60].

### I.5.5.Propriétés biologiques de l'espèce *Rosmarinus officinalis*

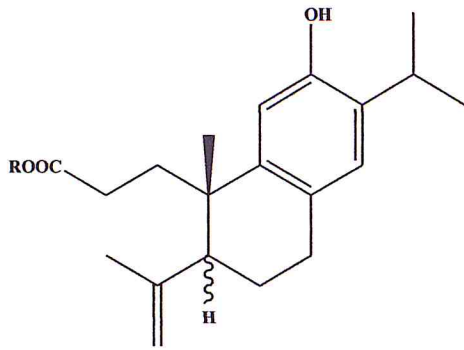
Le *Romarin* est une herbe médicinale bien connue et considérablement évaluée, largement répandue dans les produits pharmaceutiques et la médecine traditionnelle.

Elle est très appréciée pour ses propriétés aromatiques, anti-oxydantes [61], antimicrobiennes [62], [63], Activité antivirale [64], Activité anti-cancérigène [65].

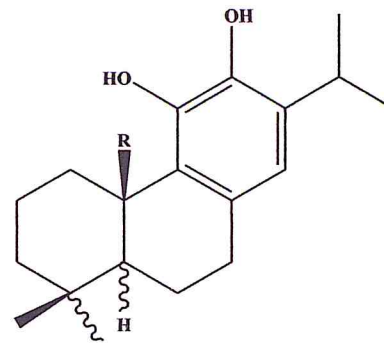
### I.5.6. Etude antérieure sur les principaux métabolites secondaires de l'espèce *Rosmarinus officinalis* L

Les principaux constituants du romarin responsables des différentes propriétés sont :

- a. **Les terpénoïdes** : deux diterpénoïdes d'abietane, le seco-Hinokiol (A) et le seco-abietane (B) ont été isolés à partir des feuilles du *R. officinalis*. En outre le carnosate méthylique (C) été synthétisé à partir de l'acide carnosique (D) [66].

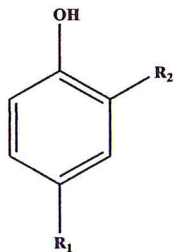


R= A= H  
R=B= CH<sub>3</sub>



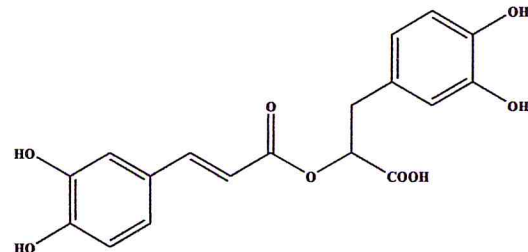
R=C= COOH  
R=D= COOMe

b. **Les acides phénoliques** : les acides phénoliques présents dans le *R. officinalis* et à des teneurs importantes sont l'acide rosmarinique, l'acide caféique et l'acide vanéllique [67].



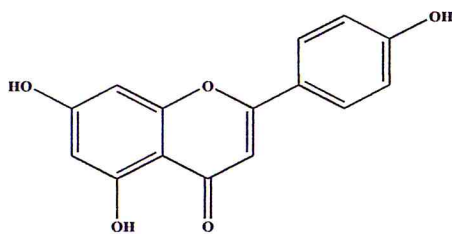
Acide vanéllique R<sub>1</sub> (COOH), R<sub>2</sub> (OCH<sub>3</sub>)

Acide caféique R<sub>1</sub> (CH=CH-COOH)

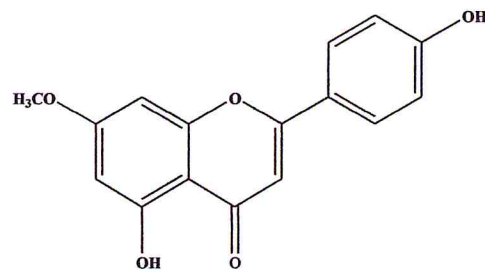


Acide rosmarinique

c. **Les flavonoïdes** : Le nom flavonoïde proviendrait du terme flavedo, désignant la couche externe des écorces d'orange, cependant d'autres auteurs supposaient que le terme flavonoïde a été plutôt prêté du flavus (flavus=jaune) [68]. Plus de dix flavonoïdes sont isolés et identifiés dans le romarin, la plupart d'entre eux sont des dérivés de flavones dont : l'apéginine, le genkwanine [67].



Apéginine



Genkwanine



### **I.5.7. Etude antérieure sur la composition chimique de l'huile essentielle de l'espèce *R. officinalis***

Les résultats de la recherche bibliographique sur la composition chimique de l'huile essentielle de l'espèce *R. officinalis* cultivée dans de différentes régions sont représentés dans le tableau n°4. Ces huiles essentielles sont obtenues par hydrodistillation puis ils ont été examinés par GC et GC/SM, afin de déterminer leurs principaux constituants.



**Tableau 4 :** La composition chimique (>3%) de l'huile essentiel de l'espèce *R. officinalis* récoltée de différentes régions

Composé	Origine							
	Tlemcen [74]	Oued souf [75]	Djelfa [76]	Laghouat [77]	Tunisie (sidi bouzid) [79]	Maroc [80]	France [81]	
$\alpha$ -Pinène	23.1%	7.50%	10.0%	9.70%	9.32%	11.4%	20.8%	
Camphre	14.5%	11.5%	33.6%	33.1%	4.18%	-	5.10%	
$\beta$ -Pinène	12.2%	-	-	-	37.75%	50.2%	36.9%	
1,8-cineol	-	29.5%	3.50%	6.40%	3.11%	-	34.2%	
2-ethyl-4,5- diméthyl phenol	-	12.0%	-	-	13.55%	9.10%	-	
Borneol	-	9.40%	-	-	6.79%	-	-	
+ $\alpha$ -terpineol	-	9.20%	-	-	4.08%	-	-	
Comphene	-	5.00%	10.5%	10.1%	-	-	-	
P-cymene	-	-	3.40%	-	-	-	-	
Limonène	-	-	4.50%	3.50%	-	-	-	

En conclusion, la composition chimique de l'huile essentielle de l'espèce *R.officinalis* varie d'une région à une autre. On remarque que le 1,8-cinéol est le composé majoritaire dans les espèces cultivées en France, en Maroc, en Tunisie et en Oued souf (Algérie) avec des pourcentages (36.9%, 50.2%, 37.75% et 29.5%) respectivement. Par contre le composé majoritaire de l'espèce récoltée à Tlemcen (Algérie) est le  $\alpha$ -pinène de pourcentage (23.1%). Par ailleurs, le composé majoritaire des autres espèces de l'Algérie (Djelfa et Laghouat), est le camphre avec des pourcentages (33.6% et 33.1%) respectivement

## **Chapitre 2 : Généralité sur l'activité antimicrobienne**

## **II.1. Définition de l'activité antimicrobienne**

Le terme antimicrobien fait référence à un ensemble de composés qui ont la capacité d'éliminer ou de réduire la prolifération de microorganisme. Les microbes visés par un antimicrobien peuvent être des bactéries, des virus, des mycètes ou des parasites. Les traitements antibiotiques font partie également des antimicrobiens. Ils ciblent les champignons ou les bactéries. Les antimicrobiens peuvent être utilisés sur l'homme, les produits alimentaires, ou pour assainir un environnement. Certaines plantes, comme l'*Origanum majorana*, *Salvia officinalis* et *Rosmarinus officinalis*, ont des propriétés antimicrobiennes<sup>34</sup>. L'intérêt des plantes microbicides a augmenté récemment car les pesticides à base de plantes et les fongicides sont inoffensifs [69] et facilement biodégradable [70].

## **I.4. Microorganisme**

Les micro-organismes sont étymologiquement des "petits organismes", donc des êtres vivants si petits qu'ils ne sont observables qu'au microscope.

Ce terme englobe une variété d'espèces très différentes, qu'elles soient procaryotes (bactéries) ou eucaryotes (levures, algues). Certains incluent aussi les virus, bien qu'ils soient à la limite du vivant [71].

## **I.3. Souches**

Une souche est un rang taxinomique de bas niveau utilisé en microbiologie et en virologie, une souche est une variante génétique ou sous-type d'un micro-organisme (virus, bactérie, champignon) [72].

## **II.4. Antibiotiques**

### **II.4.1. Définition**

Les antibiotiques sont, par définition, « des produits microbiens, ou leurs dérivés, capables de tuer les micro-organismes sensibles ou d'inhiber leur croissance » [73]. Leur action étant spécifique et dirigée contre les micro-organismes, ils ne sont pas toxiques pour les cellules eucaryotes.

L'étendue de l'activité antibactérienne d'un antibiotique définit son spectre d'action. Plus un antibiotique agit sur des espèces bactériennes différentes, plus son spectre est large. L'action des antibiotiques peut s'exercer sur des structures ou des mécanismes essentiels à la croissance ou à la survie des bactéries. Ainsi, ceux qui inhibent la croissance bactérienne sont qualifiés de «bactériostatiques» alors que ceux qui tuent les bactéries sont dits «bactéricides».



L'administration d'antibiotiques bactériostatiques suffit généralement pour arrêter un processus infectieux, le système immunitaire de l'hôte se chargeant d'éliminer les bactéries restantes. Cependant, chez les sujets immunodéprimés, le recours à un antibiotique bactéricide est recommandé

#### II.4.2. Modes d'action des antibiotiques

Les mécanismes d'action des antibiotiques sont très variables. Ils sont plus ou moins spécifiques de certaines familles bactériennes. Les antibiotiques naturels utilisés en thérapeutique sont produits par des bactéries ou des mycètes. Les antibiotiques synthétiques sont habituellement des analogues ou des dérivés d'antibiotiques naturels. Parmi des centaines d'antibiotiques connus, la plupart sont toxiques pour les cellules eucaryotes et ne sont donc pas utilisables en thérapeutiques, si ce n'est parfois comme antimétabolites [74].

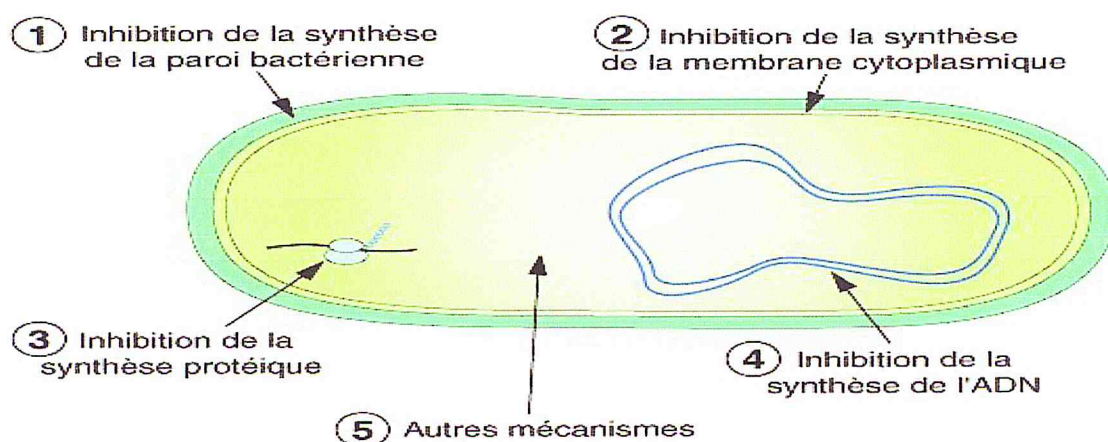


Figure 3 : mode d'action des antibiotiques.

#### I.5. La CMI et la CMB

La force relative d'un antimicrobien est déterminée par des dilutions en séries. Plus le produit est dilué en restant inhibiteur de la croissance du microorganisme, plus il est puissant. La plus faible concentration qui inhibe la croissance est appelée concentration minimale inhibitrice « CMI » [75]. Fréquemment, la CMI n'est pas totalement bactéricide, de ce fait, une partie de l'inoculum sera capable de se développer après disparition du composé inhibiteur.

Cette technique consiste à inoculer, par un inoculum standardisé, une gamme de concentration décroissante en huile essentielle et extrait éthanolique. Après incubation, l'observation de la gamme permet d'accéder à la concentration minimale inhibitrice « CMI », qui correspond à la plus faible concentration en huile et extrait capable d'inhiber la croissance bactérienne.

Concentration Minimale Bactéricide : la plus petite concentration d'antibiotique ne laissant subsister 0,01% ou moins de survivants de l'inoculum initial après 18 heures de culture à 37°C. Cette valeur caractérise l'effet bactéricide d'un antibiotique [76].

## **II.6.L'activité antimicrobienne des huiles essentielles**

L'efficacité antimicrobienne des huiles essentielles dépend de deux principaux paramètres:

L'huile essentielle et sa composition chimique d'une part, et le microorganisme (type, structure...) d'autre part.

### **II.6.1. Activité liée à la composition chimique**

L'activité des huiles essentielles est souvent réduite à l'activité de ses composés majoritaires, ou ceux susceptibles d'être actifs. Toutefois, les composés minoritaires pourraient agir de manière synergique [77].

De nombreuses études ont mis en évidence une activité antimicrobienne qualitativement similaire entre les huiles essentielles et leurs composés chimiques testés isolément. Cependant il existe des différences quantitatives. En effet, il a été prouvé que l'effet antimicrobien des huiles essentielles est supérieur à celui de ses composés majoritaires testés séparément.

### **II.6.2. Activité liée au microorganisme**

Une huile essentielle peut être biocide vis-à-vis de certaines souches, biostatique vis-à-vis d'autres ou encore n'avoir aucun effet. Ceci peut être lié au type de microorganisme (à Gram positif ou à Gram négatif), à sa forme planctonique ou en biofilm, à son métabolisme et à sa résistance.

En effet, les bactéries à Gram positif sont plus résistantes aux huiles essentielles que les bactéries à Gram négatif [77].

Par ailleurs, l'activité antimicrobienne des huiles essentielles diffère selon que la bactérie croît en forme planctonique ou au sein d'un biofilm bactérien [78].

La résistance bactérienne aux huiles essentielles, comme pour tout agent antimicrobien, semble être liée à la formation du biofilm. En effet, un isolat clinique récent peut montrer une résistance augmentée, pouvant provenir des interactions avec les cellules de l'hôte, tandis que les microorganismes évoluant sous forme planctonique sont plus susceptibles [77].



## II.7. Association des antibiotiques

En pratique clinique, les associations des antibiotiques sont particulièrement utilisées pour traiter les infections graves non documentées.

La gravité de l'infection, qu'elle soit liée à un terrain particulièrement compromis, à un germe particulièrement résistant, à un site particulièrement difficile d'accès, peut nécessiter un renforcement et/ou une accélération de la vitesse bactéricide.

Théoriquement, l'emploi d'association de un ou plusieurs antibiotiques permet :

- ✓ d'élargir le spectre antibactérien(en cas d'infections à germes multiples),
- ✓ d'obtenir un effet synergique pour renforcer la bactéricidie ou au minimum une action additive,
- ✓ de prévenir l'émergence de mutants résistants aux antibiotiques.

Les facteurs favorisant l'émergence des bactéries résistantes sont :

- L'espèce bactérienne (exemple : *Staphylococcus aureus*, *Salmonella abony*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aenuginosa*)
- L'antibiotique utilisé : certains antibiotiques, dont les mécanismes de résistances sont les plus souvent déterminismes chromosomiques, sont l'objet d'une fréquence de mutation élevée vers la résistance [79].

## II.8.Effets d'association des antibiotiques

L'interaction de deux antibiotiques peut produire quatre effets principaux :

Indifférence : l'activité d'un antibiotique n'a aucune influence sur l'activité de l'autre .

Addition : l'effet de l'association est égal à la somme des effets produits par chacun des antibiotiques pris isolément.

Synergie : l'effet de l'association est supérieur à la somme des effets produits par chacun des antibiotiques pris isolément.

Antagonisme : l'effet de l'association est inférieur à la somme des effets produits par chacun des antibiotiques pris isolément [80].

## II.9.Méthodes utilisées dans l'association des antibiotiques

De nombreuses méthodes sont utilisées dans l'association des antibiotiques, certaines simples et d'autres compliquées. Les résultats sont parfois difficiles à interpréter voire discordants [81].

## II.9.1.Méthode en point fixé

### a) Méthodes par diffusion en gélose

La méthode de diffusion en gélose consiste à déposer des disques de papier imprégnés d'antibiotiques sur une gélose ensemencée avec la bactérie à étudier.

Elles permettent une évaluation qualitative à 24 heures des effets bactériostatiques des associations. Il s'agit de placer deux disques rapprochés ou de disposer perpendiculairement deux bandelettes imprégnées d'antibiotique, à la surface d'une gélose ensemencée par la bactérie à étudier. Il s'établit dans la gélose un gradient de concentration d'antibiotique autour de chaque disque. Après 18 heures d'incubation à 37°C, il se produit un halo d'inhibition autour de chaque disque qui permet de mesurer un diamètre. Ce diamètre reflète la valeur de la CMI [82].

### b) Méthodes par dilution en milieu liquide

Parmi les méthodes de dilutions, trois techniques sont les plus utilisées : L'échiquier, Le pouvoir bactériostatique et bactéricide de l'association et l'étude du pouvoir bactériostatique et bactéricide du sérum [83].

Dans notre travail, nous avons adopté la méthode l'échiquier. Cette méthode où chaque concentration d'une gamme d'antibiotique est associée à chaque concentration d'une gamme d'un autre antibiotique, permet de calculer des coefficients de synergie : concentration fractionnelle inhibitrice (FIC), index et concentration fractionnelle bactéricide (FBC), index. Le principe est le même à la détermination des CMI (concentration minimale inhibitrice) en milieu liquide mais les concentrations d'antibiotiques sont associées entre elles deux à deux selon un schéma carré en microplaques. Après 18 heures d'incubation à 37 °C, la valeur de l'association est mesurée grâce au FIC dans les tubes où il n'y a pas de culture visible. Le résultat est exprimé en Fraction de Concentration Inhibitrice (FIC) index équivalent à la somme des FIC pour chaque molécule [84].

$$FIC = FIC (A) + FIC (B)$$

**FIC, index** : Fraction de Concentration Inhibitrice

**FIC(A)** : Fraction de Concentration Inhibitrice de A

**FIC(B)** : Fraction de Concentration Inhibitrice de B



$$\text{FIC (A)} = \frac{\text{CMI(A)m}}{\text{CMI(A)s}}$$

$$\text{FIC (B)} = \frac{\text{CMI(B)m}}{\text{CMI(B)s}}$$

**CMI (A, B) m** : CMI de mélange d'antibiotique.

**CMI (A, B) s** : CMI d'un seul l'antibiotique.

### **L'effet antibactérien est apprécié comme suit**

-L'effet synergique est défini par un  $\text{FIC} \leq 0,5$ .

-L'effet d'addition est défini par un  $0,5 < \text{FIC} \leq 1$ .

-L'effet d'indifférence est défini par un  $1 < \text{FIC} \leq 2$

-L'effet d'antagonisme est défini par un  $\text{FIC} > 2$  [84].

A l'inverse de l'effet bactériostatique, la bactéricidie n'est généralement pas proportionnelle à la concentration de l'antibiotique et le nombre de survivants peut demeurer stable pour une large gamme de concentrations. Il est donc le plus souvent impossible de définir l'interaction de deux antibiotiques en fractions de concentrations actives et de calculer un index comme dans le cas précédent.

### **II.9.2. Méthode en cinétique**

Cette méthode consiste à analyser l'évolution d'un inoculum bactérien dans le temps, en fonction de différentes concentrations d'antibiotiques seuls ou en association. Le dénombrement bactérien est effectué avant incubation ( $T_0$ ), après différents temps définis d'incubation à 37°C au cours des 6 premières heures (phase précoce) puis à 24 heures d'incubation (phase tardive).

# **Partie expérimentale**

# **Chapitre I : Description des travaux**

## I.1. Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué des feuilles de deux espèces appartenant à la famille Lamiaceae, *Salvia officinalis* et *Rosmarinus officinalis*.

Les deux plantes ont été récoltées à Chréa dans la région de Blida, au mois d'Avril 2018. Après séchage à température ambiante et à l'obscurité pendant neuf jours, les plantes ont été broyées et soumises à l'extraction.

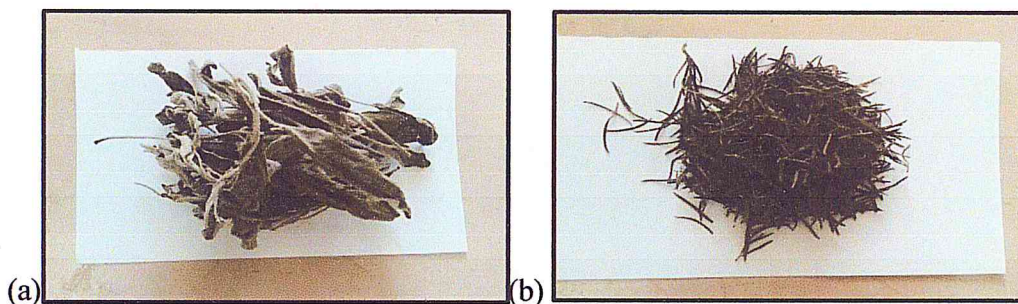


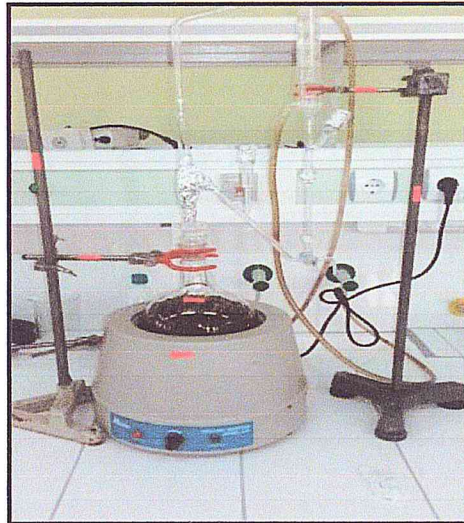
Figure 4 : Feuilles séchées de *Salvia officinalis* (a) et de *Rosmarinus officinalis* (b)

## I.2. Extraction de l'huile essentielle et préparation des extraits de l'espèce *Salvia officinalis* et *Rosmarinus officinalis*

### I.2.1. Extraction de l'huile essentielle par Hydrodistillation

L'extraction d'huiles essentielles est effectuée par hydrodistillation à l'aide d'un appareil de type Clevenger. Une quantité de 150 g de feuilles pour chaque espèce (*Salvia officinalis* et *Rosmarinus officinalis*) est transvasée dans un ballon de deux litres auquel un volume de 1500 ml d'eau distillée est ajouté. Ensuite, l'eau est portée à ébullition pendant trois heures, la vapeur d'eau entraîne les molécules volatiles qui se condensent dans un réfrigérant, qui conduit à la formation de deux phases : (a) une phase organique est appelée huile essentielle ( $HE_a$ ) et (b) une phase aqueuse (eaux aromatiques ou hydrolat aromatique) contient une quantité non négligeable d'huile soit sous forme solubilisée, soit sous forme de fines gouttelettes dispersées. La récupération de cette huile est réalisée par extraction liquide-liquide à l'éther diéthylique. Après décantation l'éther diéthylique est éliminé dans un évaporateur rotatif sous vide, une huile essentielle ( $HE_b$ ) est récupérée de cette phase.

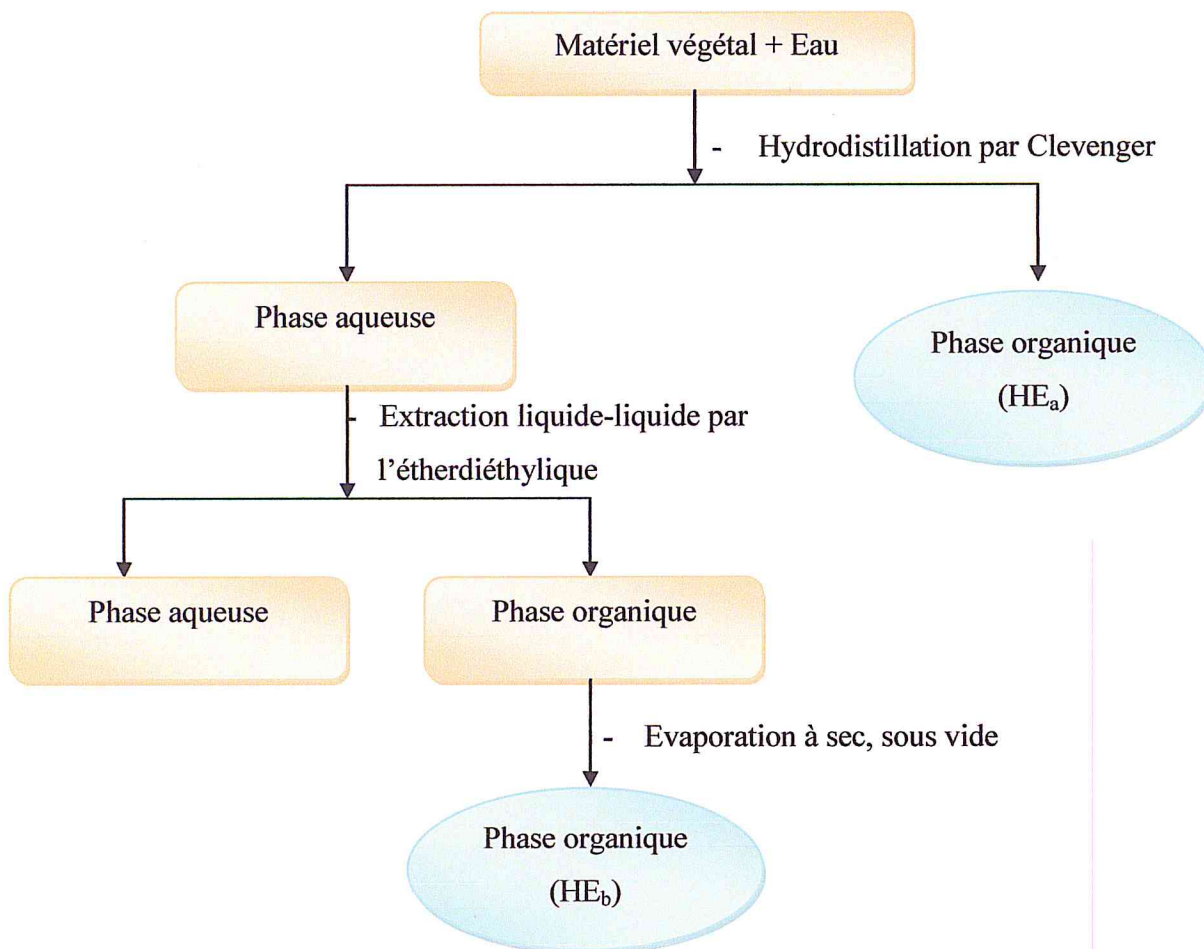




**Figure 5 :** montage de l'hydrodistillation par clevenger

A la fin, l'huile essentielle est récupérée dans des flacons fumés et conservées à 4°C jusqu'à leur utilisation ou analyse GC-MS.

Le protocole d'extraction par hydrodistillation est représenté ci-dessous



**Figure 3 :** Protocole d'extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation.

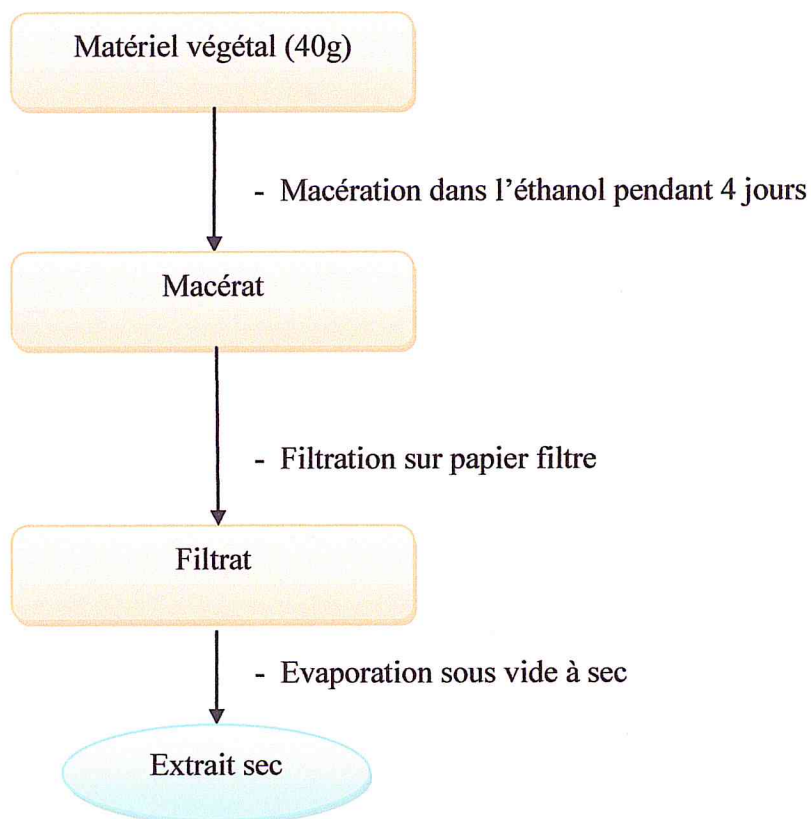
### I.2.2. Préparation des extraits par macération

Le matériel végétale de masse ( $m = 40\text{g}$ ) a subi une macération dans 500ml d'éthanol pendant 4 jours, les macéras sont filtrés sur un papier filtre, l'éthanol est éliminé du filtrat par évaporation réduite dans un rotavapeur. Les extraits obtenus sont ensuite stockés à une température ambiante jusqu'à leur utilisation.



**Figure 6** : macération du matériel végétale

Le protocole d'extraction par macération est représenté ci-dessous



**Figure 5** : Protocol d'extraction par macération

### I.2.3. Calcul du rendement

Les rendements d'extraction des huiles essentielles et des extraits sont calculés par la relation suivante :

$$Rdt \% = \frac{\text{masse d'huiles essentielles ou d'extraits}}{\text{masse initiale de matière végétale sèche}} * 100$$

On note que le rendement de l'huile essentielle est comme suit :

$$RT = RHE_b + RHE_a$$

( $R_T$ ) : rendement total de l'huile essentielle.

( $RHE_a$ ) : rendement de l'huile essentielle obtenue directement de l'hydrodistillation.

( $RHE_b$ ) : rendement de l'huile essentielle obtenue par extraction de la phase aqueuse avec l'éther diéthylique.

### I.3. Analyse des huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)

- L'analyse GC-MS des huiles essentielles des espèces étudiées *Salvia officinalis* a été effectuée sur un chromatographe en phase gazeuse 6890 GC couplée à un spectromètre de masse de type MSD, pour l'identification de différents composés, dans les conditions suivantes :

#### Injection

Température de l'injecteur = 250 °C.

Mode d'injection : Split (avec division) = 1 :50.

Volume injecté = 1 µl.

#### Colonne

ZEBRON ZB-5MS x 250.00 um (Diamètre interne) x 0.25 µm (épaisseur du film).

Température initial= 50°C

Température maximal= 350°C

Débit du gaz vecteur = 1.4 mL/min

#### Détecteur de masse

Mode d'analyse : Scan (34 à 450 amu).

Température interface = 280 °C.

Type d'ionisation = Impact électronique (IE).

Type d'analyseur : Quadripôle.



Température Quadripôle = 150 °C.

Température de la Source = 230°C.

- L'analyse GC-MS des huiles essentielles des espèces étudiées *Rosmarinus officinalis* a été effectuée sur un chromatographe en phase gazeuse CPG Agilent HP 6890 couplée à un spectromètre de masse de type HP 5973 Agilent, pour l'identification de différents composés, dans les conditions suivantes :

#### **Injection**

Température de l'injecteur = 250 °C.

Mode d'injection : Split-splitless (mode sans division).

Volume injecté = 1 µl.

#### **Colonne**

Agilent HP-5MS (30m × 0,25 mm, df = 0,25 µm).

Température initial= 40°C

Température maximal= 250°C

Débit du gaz vecteur = 1 mL/min

#### **Détecteur de masse**

Mode d'analyse : Scan (35 à 500 amu).

Température interface = 280 °C.

Type d'ionisation = Impact électronique (IE) (70 eV).

Type d'analyseur : Quadripôle.

Température Quadripôle = 150 °C.

Température de la Source = 230°C.

#### **I.4. Souches microbiennes utilisées**

Les souches utilisées dans les tests de l'activité antimicrobienne font parties des microorganismes, dont elles ont été isolées des produits pathologiques, provenant de laboratoire de recherche de chimie des substances naturelles et de biomolécules (LCSN-BioM) de l'université Saad Dahleb, Blida 1.

Dans ce travail, 10 souches bactériennes et 02 souches fongiques ont été utilisées (voir tableau 5).



**Tableau 5 : Souches microbiennes utilisées**

Nature des souches	Les souches utilisées	Gram	Références (ATCC)
Souches bactériennes	<i>Escherichia coli</i>	-	ATCC25922
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	ATCC27853
	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	ATCC25923
	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	ATCC51299
	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	-	ATCC23308
	<i>Listeria monocytogenes</i>	+	ATCC49594
	<i>Salmonella abony</i>	-	ATCC14028
	<i>Micrococcus luteus</i>	+	ATCC14110
	<i>Bacillus ceureus</i>	+	ATCC10876
	<i>Bacillus subtilus</i>	+	ATCC6051
Souches fongiques	<i>Candida albicans</i>	/	ATCC24433
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	/	ATCC 9763

### **I.5. Evaluation de l'activité antimicrobienne**

Nous avons testé l'effet antimicrobien pour les deux huiles essentielles obtenues par hydrodistillation de deux espèces étudiées, *Salvia officinalis* (HE<sub>SO</sub>) et *Rosmarinus officinalis*(HE<sub>RO</sub>), et pour les extraits éthanoliques obtenus par macération de ces deux espèces (EE<sub>SO</sub> et EE<sub>SO</sub>) sur la croissance de dix souches bactériennes et deux souches fongiques.

Deux méthodes de diffusion de la substance antimicrobienne ont été réalisées ; la méthode des puits et la méthode des disques (méthode d'antibioaromatogramme).

#### **I.5.1.La méthode des disques**

Le principe de cette méthode repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu solide dans une boîte de pétri, une suspension bactérienne incubé de 18 à 24 heures de chaque souche microbienne est préparée avec l'eau physiologique (NaCl).

Des boîtes de Pétri contenant la gélose de Mueller Hinton sont inoculées. A la surface de chaque boîte on dépose quatre disques de papier filtre (Whatman n° 5) stériles de 9 mm de diamètre imbibés par 10 µl de différentes concentration d'huile essentielle supplémentée de

DMSO (HE, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 et DMSO). L'ensemble est incubé pendant 24 heures à 37°C pour les souches bactériennes et 48 heures à 26°C pour les levures. Cette méthode est dite l'aromatogramme [85].

DMSO : diméthyl sulfoxyde.

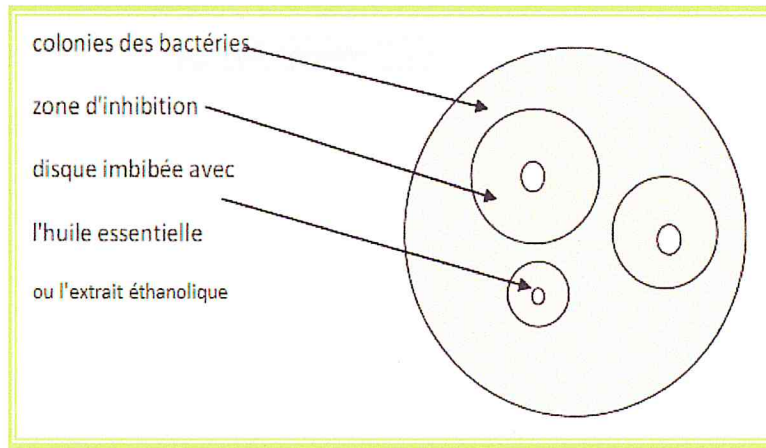


Figure 7: Méthode de diffusion sur disque

- **Repiquage des souches microbiennes**

Afin d'obtenir des souches pures et jeunes, nous avons effectué un prélèvement des souches bactériennes et des levures qui sont testés par anse et ensemencés selon la méthode de stries sur une boîte de Pétri coulée par gélose nutritive et Sabouraud puis incubé 18 à 24 heures à 37°C pour les souches bactériennes et à 26°C pendant 48h pour les levures.

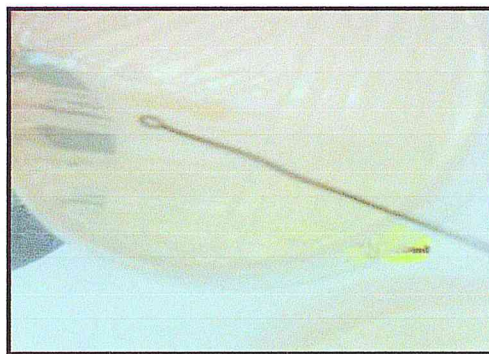
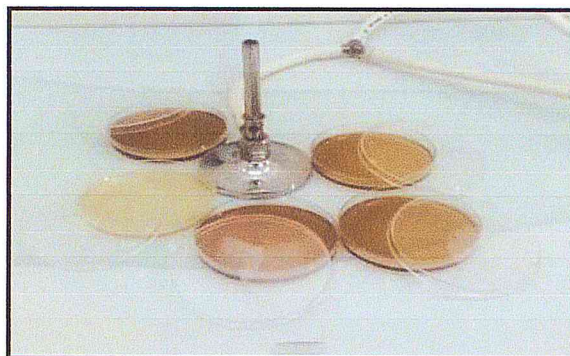


Figure 8: Repiquage des souches

- **Préparation du milieu de culture**

Le milieu est préparée en dissolvant dans un erlenmeyer, on introduit 38g de poudre de gélose pour Mueller –Hinton (MH) et 32.5g de poudre pour Sabouraud (SAB) de gélose avec 1000 ml d'eau distillé. Ensuite, le mélange est chauffé sur une plaque chauffante avec agitation continue pour dissoudre la poudre de gélose. Une fois la gélose est dissoute, elle est versée

dans des flacons puis stérilisé dans l'autoclave à 120°C pendant 20min. en fin, elle est conservée dans le réfrigérateur à 4°C. Avant l'utilisation le milieu de culture Mueller-Hinton ou Sabouraud est fondé dans un bain marie à 95°C et coulé en boite de pétrie avec une épaisseur de 3 mm (environ 10 ml par boite), les gélases sont pré-séchées avant l'emploi.



**Figure 9:** Ecoulement du milieu de culture.

- **Préparation des disques**

Les disques de 9mm et 6mm de diamètre sont stérilisés à 120°C pendant 15 min par autoclavage puis sont chargés de l'huile essentielle ou de l'extrait à tester.

- **Préparation des extraits**

L'extrait éthanolique a été solubilisé dans le DMSO pour obtenir une concentration de 20mg.mL<sup>-1</sup> et 40mg.mL<sup>-1</sup>. Par contre, l'huile essentielle a été utilisée directement sans faire des dilutions.

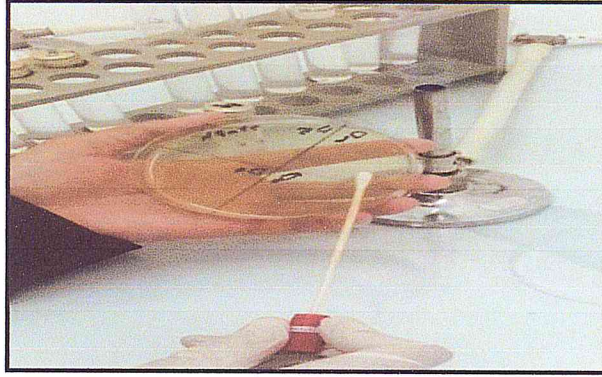
- **Préparation de l'inoculum**

A partir des boites contenant les germes pathogènes et des pré-cultures congelées, on racle 3 colonies à l'aide d'une pipette pasteur, puis on la décharge dans un tube de l'eau physiologique stérile.

- **Ensemencement**

L'ensemencement est fait à l'aide d'un écouvillon stérile trempé dans la suspension microbienne. Puis on flotte l'écouvillon sur la totalité de la surface de MH et SAB, en haut et en bas, en strie serrées, un étalement uniforme en nappe.





**Figure 10:** Ensemencement microbienne

- **Dépôt des disques**

A l'aide d'une pince stérile, les disques stérilisés de 9mm de diamètre, sont imbibés et imprégnés par différentes concentrations des solutions à tester. Le volume pris de chaque concentration est de l'ordre de 20  $\mu$ L, et sont déposés sur la surface de gélose inoculée avec les souches testées. Les boîtes de pétri sont incubées à l'étuve pendant 24h à 37°C pour les bactéries et 48h à 26°C pour les levures et les champignons.



**Figure 11 :** dépôt des disques

- **Lecture de l'aromatogramme**

L'activité antimicrobienne se manifeste par l'apparition d'un halo d'inhibitions de la croissance microbienne autour des disques contenant l'extrait à tester.

Le résultat de cette activité est exprimé par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisé par des croix. La souche ayant un diamètre :

- $D < 10\text{mm}$ : Souches résistante(-).
- $10\text{mm} \leq D \leq 16\text{mm}$  : Souches sensible(+).
- $16\text{mm} \leq D \leq 28\text{mm}$  : Souches très sensible (++) .
- $D > 28\text{mm}$  : Souches extrêmes sensible (+++) [86].



### **I.5.2. La méthode des puits**

Cette méthode repose sur la diffusion de la substance inhibitrice dans des puits creusés dans une gélose contenant dans sa surface une souche indicatrice (souche bactérienne ou fongique). Les boîtes sont mises à incubées dans une étuve à 26°C pendant 48h pour les levures et à 37°C pendant 24h pour les bactéries.

### **I.6. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)**

Comme nous l'avons déjà décrit dans la partie théorique, la CMI est définie comme étant la plus faible concentration d'antibiotique (mg/l) pour laquelle il n'y a pas de croissance visible de la souche microbienne étudiée. Son but est d'établir le niveau de sensibilité des pathogènes envers les agents antimicrobiens en l'occurrence des huiles essentielles et des extraits dans notre cas.

Cette CMI est déterminée selon la méthode de dilution en milieu liquide pour les huiles et la méthode de dilution sur gélose.

#### **I.6.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice en milieu liquide [87]**

- **Préparation du milieu nutritif**

Le milieu nutritif utilisé pour déterminer la concentration minimale inhibitrice en milieu liquide, est préparé en dissolvant 0.6g de l'extrait de bœuf avec 1g de NaCl, 2g de peptone et 100 µl de NaOH dans 200ml d'eau distillé. Le mélange est placé sur une plaque chauffante avec agitation continue. L'extrait de bœuf dissout est versé dans des tubes à essais puis stérilisé dans l'autoclave à 120°C pendant 20min.

- **Préparation de l'inoculum (pré-culture)**

A l'aide d'une pipette pasteur quelques colonies bien isolées et identiques de chacune des souches bactériennes sont raclées et déchargées dans 100 ml de milieu de culture stérile, puis agiter et incubé dans un chaker pendant 24 h à 37 °C.

- **Préparation des suspensions bactériennes**

À partir d'une culture de 18h à 24h, nous avons préparé la suspension bactérienne et ajusté sa concentration à  $10^6$  UPC/ml.

- **Préparation des séries des dilutions**

Une série de sept tubes à hémolyse avec le milieu de culture liquide a été préparé. Le premier tube contient 4 ml et les autres 2 ml de la solution de culture. La solution mère est préparée en introduisant, dans le premier tube, 200 µl de l'huile essentielle pour l'espèce *S. officinalis* et 80 µl pour l'espèce *R. officinalis*. À partir de cette solution, nous avons réalisé des dilutions binaires (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32) de l'huile puis 2 ml du dernier tube ont été jetés. En fin la même quantité de la souche bactérienne a été versée dans les tubes.

Plusieurs souches bactériennes (A, B, C, D) pour *Salvia officinalis* et (A', B', C', D') pour *Rosmarinus officinalis* ont été testés.

	Les souches bactériennes
A et A'	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
B et B'	<i>Staphylococcus aureus</i>
C et C'	<i>Bacillus subtilis</i>
D et D'	<i>Escherichia coli</i>

Il reste un tube témoin de croissance de la souche à tester. Enfin une quantité de la pré-culture (100 µl/ml) est ajoutée dans chaque tube et incubée à 37 °C pendant 24 heures.

- **Lecture des résultats**

Les résultats de la concentration minimale inhibitrice sont obtenus à partir des tubes pour lesquels il n'y a pas de croissance visible après 24 h d'incubation à 625nm.

### **I.6.2. Détermination de la CMI par la méthode de diffusion sur gélose [88]**

Les extraits ayant montré une activité antibactérienne positive, sont sélectionnés pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) par la méthode de diffusion sur gélose. La CMI d'un extrait vis-à-vis une souche donnée correspond à la plus petite concentration ne montrant aucune croissance visible de germe. Des dilutions successive de progression arithmétique de raison 2 ont permis de préparer une gamme de dilution (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32).

- **Préparation du milieu Mueller –Hinton**

Dans un erlen, nous avons dissout 19g de poudre de gélose dans 500 ml d'eau distillé, puis le mélange a été placé sur une plaque chauffante avec agitation continue. La gélose dissoute a été versée dans des flacons, chaque flacon contient 19ml de milieu, puis stérilisé dans l'autoclave à 120C° pendant 20min.

- **L'ensemencement**

Nous avons réalisé un prélèvement des souches bactériennes par pipette pasteur et l'ensemencé sur une boite de Pétri coulée par gélose nutritive sous forme des cercles. Ce dernier a été incubé pendant 18 à 24 heures à 37 °C.

- **Préparation des séries des dilutions des extraits éthanoliques**

Dans un tube à essai, l'extrait éthanolique obtenu par macération, a été dissout avec 1ml de DMSO et versé dans le milieu de culture préparé puis coulé en boite de pétrie, les géloses sont pré-séchées avant l'emploi.

Les séries de dilution d'huiles essentielles et d'extraits éthanoliques des deux espèces étudiées sont regroupés dans les tableaux suivants.

**Tableau 6 :** La série de dilution d'huiles essentielles de *Salvia officinalis* et du *Rosmarinus officinalis*

<b>Tube</b>	<b>Dilution</b>	<b>Concentration de HE<sub>SO</sub> (en µl)</b>	<b>Concentration de HE<sub>RO</sub> (en µl)</b>
1	SM	50	20
2	1/2	25	10
3	1/4	12.5	5
4	1/8	6.25	2.5
5	1/16	3.125	1.25
6	1/32	1.562	0.625



**Tableau 7 :** La série de dilution des extraits éthanoliques de *Salvia officinalis* et du *Rosmarinus officinalis*.

Tube	Dilution	Concentration d'EE pour <i>E.coli</i> (en mg/ml)	Concentration d'EE pour les autres souches (en mg/ml)
1	SM	40	30
2	1/2	20	15
3	1/4	10	7.5
4	1/8	5	3.75
5	1/16	2.5	1.875
6	1/32	1.25	0.9375

### I.7. Détermination de l'effet d'association antimicrobienne

Afin de réaliser le test d'effet d'association, nous avons utilisé la méthode de dilution en milieu liquide pour étudier l'association des deux huiles essentielles des deux espèces *Salvia officinalis* et *Rosmarinus officinalis* ; et la méthode de diffusion sur gélose pour étudier l'association des deux extraits éthanoliques de ces deux espèces.

On a pesée trois fois la moitié (1/2) de la masse de la concentration initiale inhibitrice puis on a pesée trois fois un quart (1/4) et (1/8) de la CMI pour chaque espèce, on les mélange selon les tableaux suivants :

- **Test de synergisme**

**E** : huile essentielle ou extrait éthanolique de l'espèce *S.officinalis*

**D** : huile essentielle ou extrait éthanolique de l'espèce *R.officinalis*

**E<sub>1</sub>** : 1/2 CMI

**D<sub>1</sub>** : 1/2 CMI

**E<sub>2</sub>** : 1/4 CMI

**D<sub>2</sub>** : 1/4 CMI

**E<sub>3</sub>** : 1/8 CMI

**D<sub>3</sub>** : 1/8 CMI

E<sub>1</sub> D<sub>1</sub>    E<sub>2</sub> D<sub>1</sub>    E<sub>3</sub> D<sub>1</sub>

E<sub>1</sub> D<sub>2</sub>    E<sub>2</sub> D<sub>2</sub>    E<sub>3</sub> D<sub>2</sub>

E<sub>1</sub> D<sub>3</sub>    E<sub>2</sub> D<sub>3</sub>    E<sub>3</sub> D<sub>3</sub>



## **CHAPITRE 2 : Résultats et discussion**

## II.1. Résultats de l'extraction

### II.1.1. Calcul des rendements

Les rendements moyens en huiles essentielles obtenus, qui ont été calculés en fonction de la masse du matériel végétal sec, varient sensiblement entre les deux plantes.

**Tableau 8** : Masses et rendements d'huiles essentielles et d'extraits de *S. officinalis* et *R. officinalis*

Espèce	Huile essentielle			Extrait éthanolique	
	Masse	Valeur expérimentale	Référence	Masse	Rendement
<i>Salvia officinalis</i>	150g	0.92%	/	40g	19.5%
<i>Rosmarinus officinalis</i>	150g	0.6%	0.5-2 %	40g	29.75%

D'après le tableau 8, on remarque que le rendement de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* 0.6% est conforme avec les normes AFNOR (0,5-2). Et le rendement de l'extrait éthanolique 29.75% de l'espèce *R.officinalis* est moyennement élevé par rapport le rendement de l'extrait éthanolique de *S.officinalis* 19.5%.

### II.1.2. Caractéristiques organoleptiques

Les huiles essentielles de *Salvia officinalis* et *Rosmarinus officinalis* extraites par hydrodistillation dans un appareil type Clevenger, sont des liquides mobiles, de coloration jaune pâle. L'huile essentielle de *Salvia officinalis* possède une odeur caractéristique, tandis que, l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* a une odeur camphrée.

Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 9.

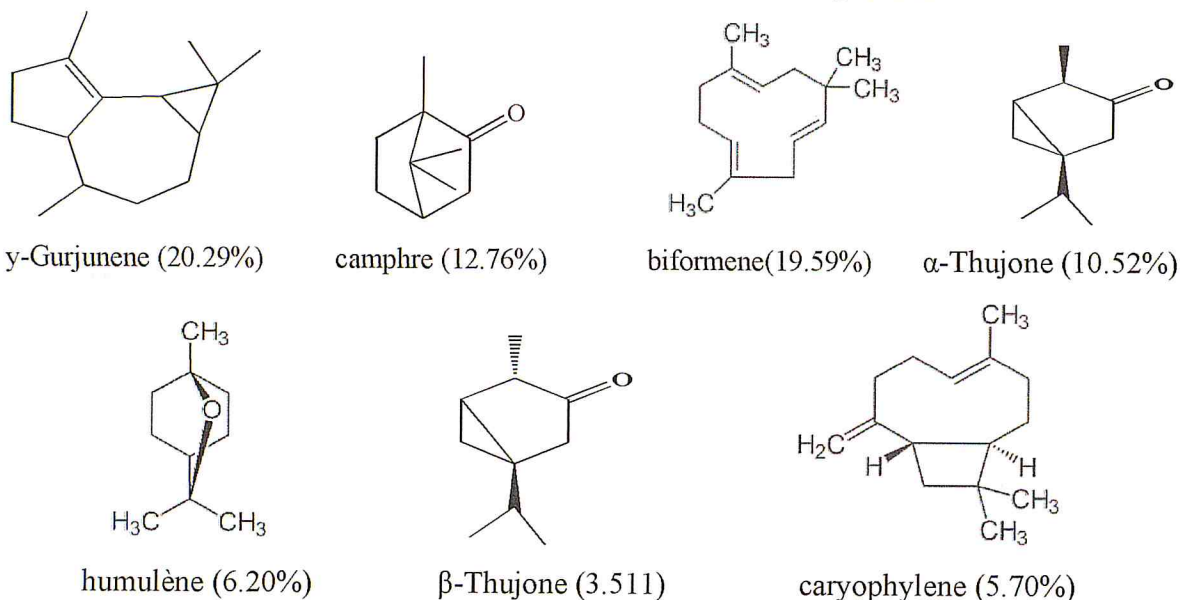
**Tableau 9** : Caractéristiques organoleptiques d'huiles essentielles et d'extraits de *S. officinalis* et *R. officinalis*

	Aspect	Couleur	Odeur
Norme AFNOR Pour HE de <i>Rosmarinus officinalis</i>	Liquide mobile, limpide	Presque incolore à jaune pâle	Caractéristique fraîche, plus ou moins camphrée selon l'origine
HE <sub>RO</sub>	Liquide mobile	Jaune pâle	Camphrée
HE <sub>SO</sub>	Liquide mobile	Jaune pâle	Caractéristique

D'après les résultats obtenus, on remarque que les paramètres organoleptiques de l'huile essentielle sont en accord avec ceux répertoriés dans les normes AFNOR [89].

## II.2. Analyse GC-MS des huiles essentielles

- 36 composants, représentant un total de 92.73 % de l'huile essentielle du *Salvia officinalis*, ont été identifiés (figure 12). Cette huile est majoritairement composée de :

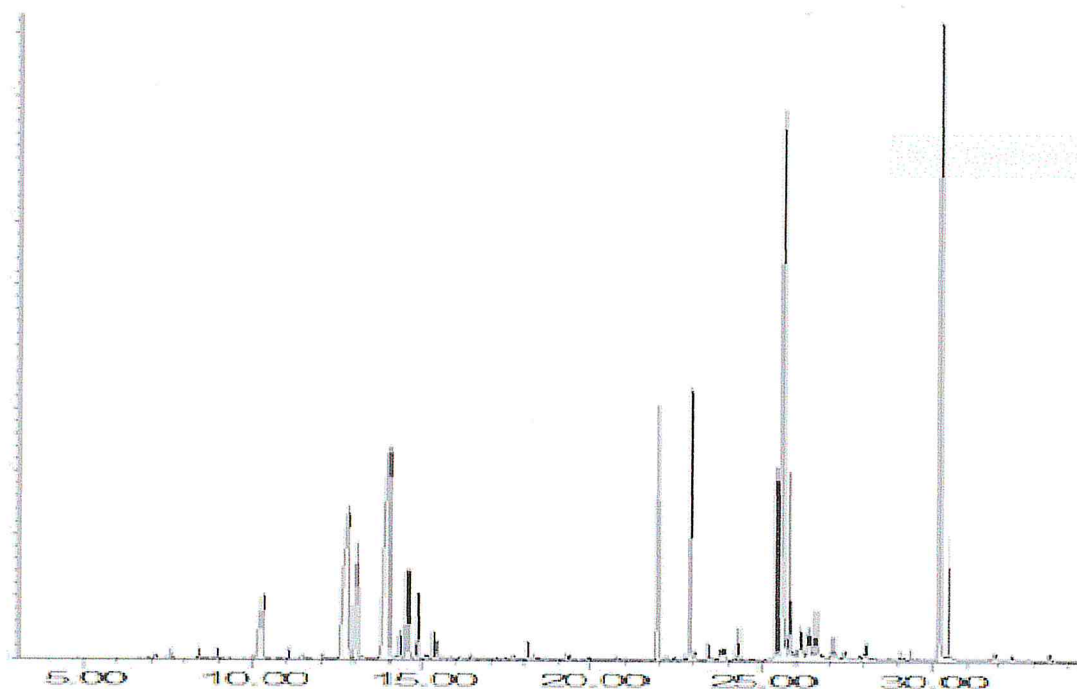


Les composés obtenus, listés selon leur ordre d'élution dans la colonne, sont résumés dans le tableau suivant :

**Tableau 10** : Composition de l'huile essentielle du *Salvia officinalis*

	Composé	Tr (min)	Pourcentage (%)
1	Camphene	7.540	0.149
2	$\beta$ - pinène	8.431	0.217
3	$\beta$ -myrcène	8.934	0.116
4	1,8-cinéole	10.272	2.533
5	$\gamma$ -Terpinène	11.089	0.187
6	Terpinolene	12.038	0.099
7	$\alpha$ -Thujone	12.815	<b>10.525</b>
8	$\beta$ -Thujone	13.078	<b>3.511</b>
9	Camphre	14.009	<b>12.769</b>
10	Trans-3-pinanone	14.347	0.486
11	Isobotneol	14.558	2.281
12	Isocanphopinone	14.770	0.232
13	$\gamma$ -terpinene	14.890	1.178
14	1-bornyl-acétate	18.107	0.358
15	Verbenene	19.250	0.107
16	Cyclopentanethicone	19.365	0.086

17	Caryophyllene	21.959	<b>5.703</b>
18	$\alpha$ -humulène	22.874	<b>6.206</b>
19	(-) Aromadendrene	23.028	0.233
20	$\alpha$ -Amorphene	23.383	0.245
21	$\alpha$ -Selinene	23.811	0.188
22	Cyclomethicone	23.863	0.220
23	$\gamma$ - Cadinene	24.188	0.199
24	Delta-cadinene	24.348	0.429
25	(3E,5E,8E)-3,7,11-trimethyl-1,3,5,8,10-dodecapentaene	25.412	2.490
26	$\gamma$ -Gurjunene	25.640	<b>20.240</b>
27	Nealloocinene	25.732	0.278
28	Cadrene	26.029	0.085
29	$\alpha$ -Amorphene	26.200	0.165
30	Ermophilene	26.343	0.257
31	$\beta$ - Gurjunene	26.372	0.206
32	(3E,5E,8E)-3,7,11-trimethyl-1,3,5,8,10-dodecapentaene	26.583	0.633
33	Dehydro aromadendrene	28.115	0.294
34	Ent- pimara-8,15-diène	29.069	0.092
35	Biformene	30.247	<b>19.5937</b>
36	2-butoxy-4-(2-pyridyl-2-t-butyl-6-methyl ) pyridine	33.436	0.144



**Figure 12:** Profil chromatographique d'analyse de l'huile essentielle de *Salvia officinalis*

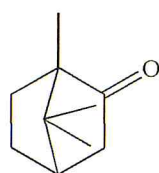


Les études menées sur la composition de l'huile essentielle de l'espèce *salvia officinalis* ont montrés que les constituants majoritaires de cette huile sont : 1,8-cinéol [44], borneol [40], camphre [40], azulène [45] et  $\alpha$ -Thujone [43].

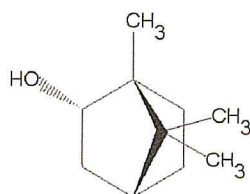
Par ailleurs, les travaux effectués sur l'huile essentielle de l'espèce *salvia officinalis* cultivée en Bulgarie [42] ont montrées la présence de  $\alpha$ -Thujone (29.40%),  $\beta$ -Thujone (17.40%), Camphre (11.70%) et 1,8-cinéol (12.5%) comme principaux constituants. Ainsi que l'existence de l'humulène et camphène en faible quantité.

En comparaison avec les travaux effectués sur l'espèce *Salvia officinalis*, nous pouvons constater que la composition de notre huile essentielle est très proche à celle de l'espèce cultivée au Bulgarie [42] et cela dans l'existence des composés suivants :  $\alpha$ -Thujone,  $\beta$ -Thujone, Camphre et humulène.

- L'analyse GC-MS des feuilles de l'espèce *Rosmarinus officinalis* a montrée l'existence de 46 composés (98.03%) (Tableau 11). Au total, cinq (5) composés chimiques qui représentent environ 58.16 % de la composition totale, sont majoritaires. Il s'agit de :



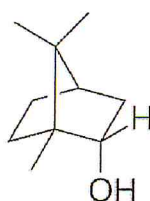
Camphre (15.69%)



1,8-cineol (15.42%)



$\alpha$ -pinène (8.53%)



Borneol (11.15%)



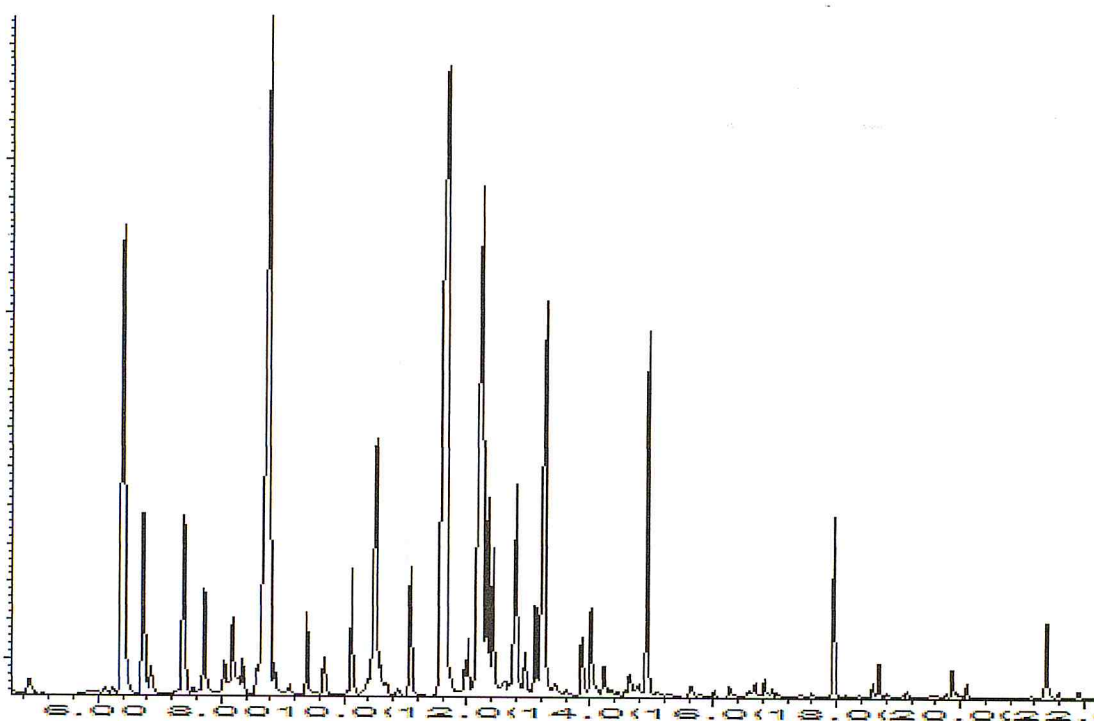
Verbenone (7.19%).

Les composés obtenus, listés selon leur ordre d'élution dans la colonne, sont résumés dans le tableau suivant :

**Tableau 11** : Composition de l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis*

	Composé	Tr (min)	Pourcentage (%)
1	Tricyclène	6.11	0.47
2	$\alpha$ -pinène	6.40	8.53
3	Camphène	6.73	2.56

4	verbenene	6.86	0.39
5	$\beta$ -pinène	7.39	2.31
6	$\beta$ -myrcene	7.73	1.30
7	1-phellandrene	8.06	0.46
8	Delta-3-carene	8.19	1.14
9	$\alpha$ -terpinene	8.36	0.88
10	1,8-cinéole	8.79	<b>15.42</b>
11	$\beta$ -trans-ocimene	8.87	0.37
12	$\beta$ -cis-ocimene	9.12	0.11
13	$\gamma$ -terpinene	9.39	0.89
14	Trans-sabinene	9.68	0.47
15	$\alpha$ -terpinolene	10.13	1.26
16	linalool	10.52	5.22
17	1,2,5,5-tetramethyl-1,3-cyclopentadienne	10.69	0.18
18	Chrysanthenone	11.08	1.53
19	Camphre	11.67	<b>15.69</b>
20	Pinocarvone	12.02	0.93
21	Borneol	12.25	<b>11.15</b>
22	Isopinocampnone	12.34	2.40
23	4-terpineol	12.43	1.64
24	Acide octanoïque	12.67	0.51
25	P-menth-1-en-8-ol	12.80	3.06
26	Myrtenol	12.95	0.58
27	Nopol	13.12	0.97
28	Verbenone	13.28	<b>7.19</b>
29	Trans-carveol	13.44	0.22
30	Octahydro-4,7-methanindene	13.87	0.78
31	Geraniol	14.23	0.44
34	Citral	14.57	0.06
35	Acide nonanoïque	14.84	0.33
36	Acetate de bornyl	14.94	3.85
37	2,4-decadienal	15.63	0.24
38	5-pentyl-2(5H)-furanone	16.26	0.31
39	Eugenol	16.59	0.15
40	Camphene	16.84	0.17
41	Caryophyllene	17.95	1.78
42	Cis-geranylacetone	18.58	0.16
43	Humulene	18.68	0.32
44	2,6-bis-(1,1-diméthylethyl)-4-méthylphénol	19.87	0.36
45	Delta-cadienene	20.10	0.15
46	Oxyde de caryophyllene	21.39	0.79



**Figure 13:** Profil chromatographique d'analyse de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*

Des études réalisées sur cette espèce récoltée de la région de Tlemcen ont montrées que le composé majoritaire est  $\alpha$ -pinène (23.1%), le composé majoritaire en Oued souf et en Djelfa, est le 1,8-cineol. Cette différence de composition est due probablement à diverses conditions notamment l'environnement, la période de récolte, le lieu de séchage, la durée et la méthode d'extraction.

La composition chimique de notre huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* est très proche à celle de l'espèce cultivée à l'Oued souf. A cause de l'existence des composés suivants : le camphre, le 1.8-cineol, le  $\alpha$ -pinène et le borneol.

### II.3. Etude de l'activité antimicrobienne par la méthode de l'aromatogramme

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits de *S.officinalis* et *R.officinalis* a été évaluées par la méthode de l'aromatogramme (méthode de diffusion sur milieu gélosé), vis-à-vis 12 germes pathogènes (10 souches bactériennes (tableau 5) et 2 levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida albicans*).



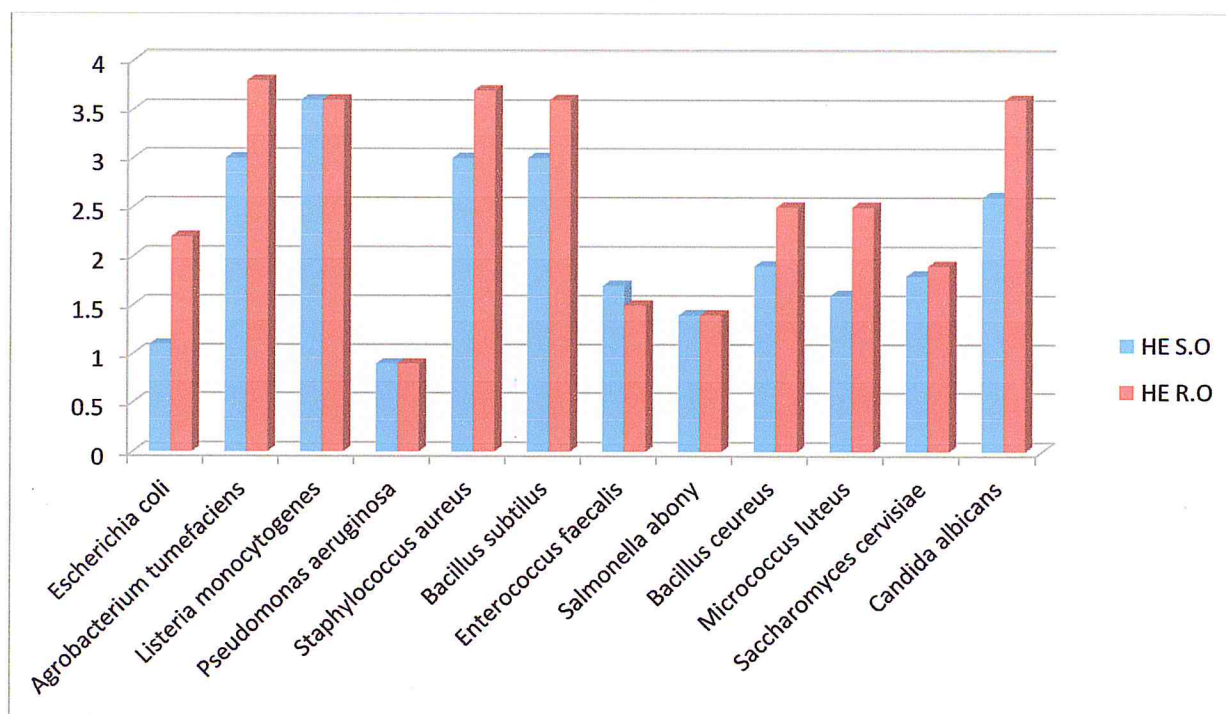
Le pouvoir antimicrobienne de ces huiles essentielles et extraits est obtenu par la mesure du diamètre de zone d'inhibition des microorganismes en (cm) à l'aide d'une règle.

Les résultats obtenus de l'aromatogramme sont représentés dans les tableaux ci-dessous

**Tableau 12 :** Les résultats de l'aromatogramme des huiles essentielles des deux espèces étudiées *S.officinalis* et *R.officinalis*.

Souches	Diamètre d'inhibition (D) en cm	
	HE <sub>SO</sub> (D1)	HE <sub>RO</sub> (D2)
<i>Escherichia coli</i>	1.1	2.2
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	3	3.8
<i>Listeria monocytogenes</i>	3.6	3.6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.9	0.9
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	3.7
<i>Bacillus subtilis</i>	3	3.6
<i>Enterococcus faecalis</i>	1.7	1.5
<i>Salmonella abony</i>	1.4	1.4
<i>Bacillus ceureus</i>	1.9	2.5
<i>Micrococcus luteus</i>	1.6	2.5
<i>Saccharomyces cervisiae</i>	1.8	1.9
<i>Candida albicans</i>	2.6	3.6

Ces résultats sont également représentés sur l'histogramme suivant :



**Figure 14:** Les diamètres de la zone d'inhibition des huiles essentielles relatives aux différentes souches microbiennes.



L'huile essentielle de *Salvia officinalis* a une action inhibitrice puissante sur les souches *Listeria monocytogenes*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* avec un diamètre d'inhibition (D) supérieur ou égale 3.6 cm. Par contre, les deux souches bactériennes ; *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* se sont avérées résistantes avec  $D \leq 1.1$  cm.

Par ailleurs, l'huile essentielle de *Salvia officinalis* montre une très bonne l'activité antifongique vis-à-vis la souche *Candida albicans* avec  $D \geq 2.6$  cm.

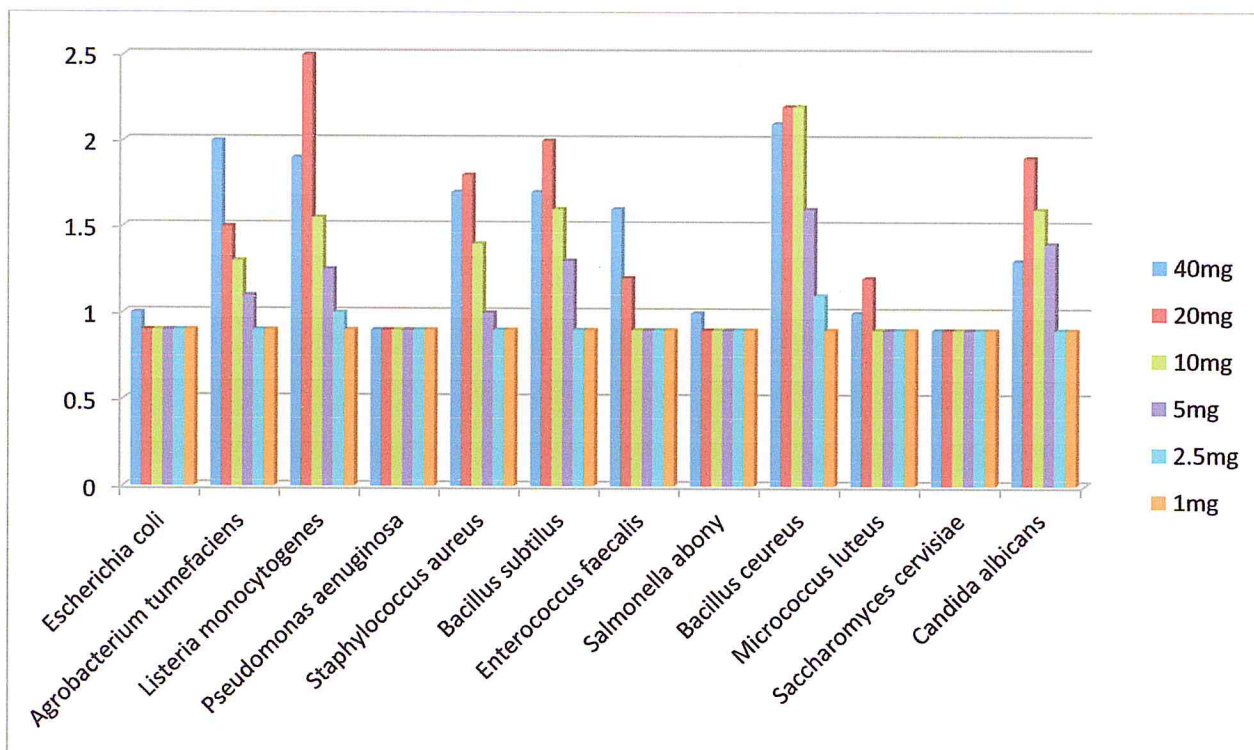
Pour l'espèce *Rosmarinus officinalis*, on remarque que son huile essentielle a une activité l'activité bactéricide extrêmement importante vis-à-vis les souches ; *Agrobacterium tumefaciens*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* et *Bacillus subtilis* ( $D \geq 3.6$  cm) et importante vis-à-vis les deux souches ; *Bacillus ceureus* et *Micrococcus luteus* dont le diamètre de la zone d'inhibition est de 2.5cm. Le plus faible diamètre d'inhibition est enregistré pour la souche *Pseudomonas aenuginosa* ( $D = 0.9$ cm). On observe également que l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* a une activité antifongique importante contre les deux levures ; *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida albicans*, notamment vis-à-vis cette dernière ( $D = 3.6$ cm).

D'après les résultats de l'histogramme, on remarque que l'huile essentielle de l'espèce *R. officinalis* possède une activité antimicrobienne puissante vis-à-vis de l'huile essentielle de *S.officinalis* surtout contre les bactéries à gram (-) comme *Escherichia coli*.

**Tableau 13** : Les résultats de l'aromatogramme de l'extrait éthanolique de l'espèce *Salvia officinalis*

	40mg	20mg	10mg	5mg	2.5mg	1mg
<i>Escherichia coli</i>	1	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	2	1.5	1.3	1.1	0.9	0.9
<i>Listeria monocytogenes</i>	1.9	2.5	1.55	1.25	1	0.9
<i>Pseudomonas aenuginosa</i>	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.7	1.8	1.4	1	0.9	0.9
<i>Bacillus subtilus</i>	1.7	2	1.6	1.3	0.9	0.9
<i>Enterococcus faecalis</i>	1.6	1.2	0.9	0.9	0.9	0.9
<i>Salmonella abony</i>	1	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9
<i>Bacillus ceureus</i>	2.1	2.2	2.2	1.6	1.1	0.9
<i>Micrococcus luteus</i>	1	1.2	0.9	0.9	0.9	0.9
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9
<i>Candida albicans</i>	1.3	1.9	1.6	1.4	0.9	0.9

Les résultats mentionnés dans le tableau ci-dessus sont également représentés sur l'histogramme suivant :



**Figure 15 :** Les diamètres de la zone d'inhibition de différentes concentrations de l'extrait éthanolique de *S. officinalis* relatives aux différentes souches microbiennes.

D'après les résultats obtenus, on peut constater que le diamètre d'inhibition le plus élevé pour l'extrait de cette espèce est enregistré vis-à-vis la souche *Listeria monocytogenes* à une concentration de 20mg/ml.

L'extrait éthanolique de l'espèce *S. officinalis* a montré une action bactéricide sur les souches *Agrobacterium tumefaciens*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilus*, *Bacillus ceureus*, *Enterococcus faecalis* avec  $D \geq 1.6$  cm. Les autres souches bactériennes sont résistantes. Concernant l'activité anti-fongique, la souche *Candida albicans* est très sensible,  $D = 1.9$  cm à la concentration 20mg/ml.

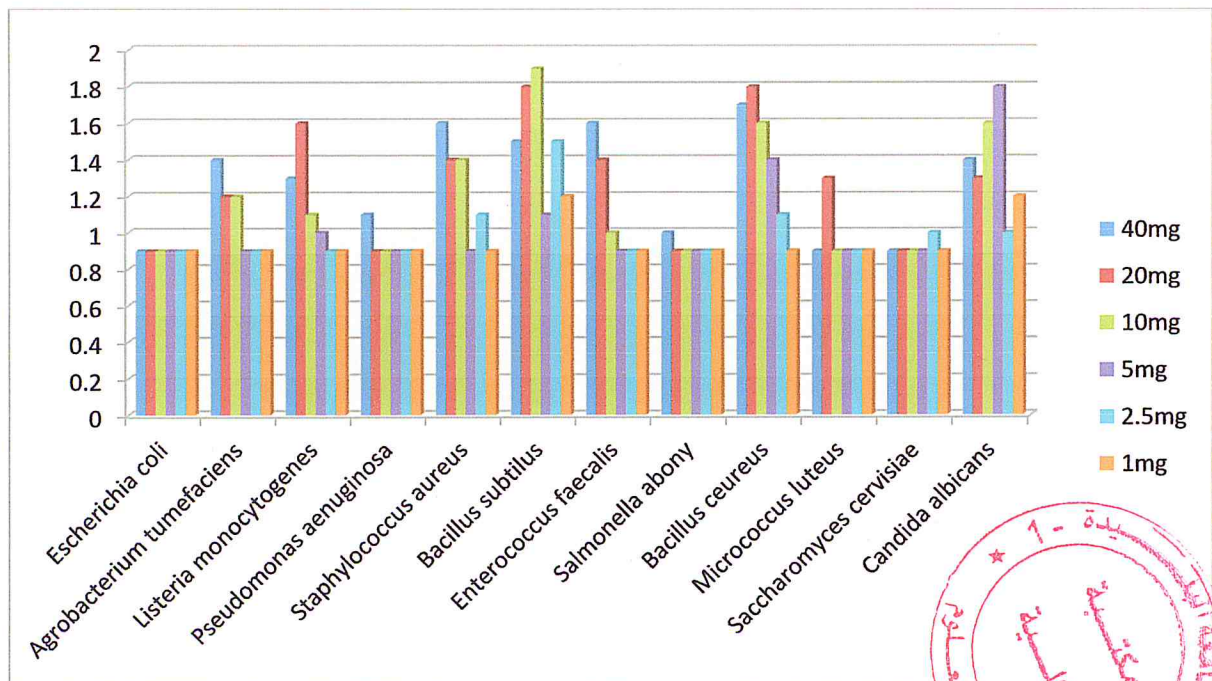
**Tableau 14 :** Les résultats de l'aromatogramme de l'extrait éthanolique de l'espèce *Rosmarinus officinalis*

Souche	40mg	20mg	10mg	5mg	2.5mg	1mg
<i>Escherichia coli</i>	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	1.4	1.2	1.2	0.9	0.9	0.9



<i>Listeria monocytogenes</i>	1.3	1.6	1.1	1	0.9	0.9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1.1	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.6	1.4	1.4	0.9	1.1	0.9
<i>Bacillus subtilus</i>	1.5	1.8	1.9	1.1	1.5	1.2
<i>Enterococcus faecalis</i>	1.6	1.4	1	0.9	0.9	0.9
<i>Salmonella abony</i>	1	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9
<i>Bacillus ceureus</i>	1.7	1.8	1.6	1.4	1.1	0.9
<i>Micrococcusluteus</i>	0.9	1.3	0.9	0.9	0.9	0.9
<i>Saccharomyces cervisiae</i>	0.9	0.9	0.9	1	1	0.9
<i>Candida albicans</i>	1.4	1.3	1.6	1.8	1	1.2

L'histogramme suivant représente les résultats obtenus de l'étude de l'activité antimicrobienne de l'extrait éthanolique de l'espèce *Rosmarinusofficinalis*



**Figure 16** : Les diamètres de la zone d'inhibition de différentes concentrations de l'extrait éthanolique de *Rosmarinusofficinalis* relatives aux différentes souches microbiennes.

Les résultats obtenus ont révélé l'efficacité de l'extrait éthanolique de l'espèce *Rosmarinus officinalis* vis-à-vis les quatre souches bactériennes à savoir ; *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilus*, *Enterococcus faecalis* et *Bacillus ceureus* dont le diamètre d'inhibition est supérieur à 1.5cm pour la concentration 40mg/ml et à 1.4cm pour la concentration 20mg/ml.



Pour l'activité antifongique, le diamètre d'inhibition le plus élevé est celui enregistré vis-à-vis la souche *Candida albicans* (D = 1.8cm à une concentration de 5mg/ml).

En fin, les diamètres de la zone d'inhibition des antibiotiques références sont représentés dans le tableau 15.

**Tableau 15** : Les résultats de l'aromatogramme des antibiotiques références

	Erythromycine	HLS	CTR	Gentamicine	DMSO
Gram	-	-	+	+	/
<i>Escherichia coli</i>	1.1	2.5	3.8	2.0	/
<i>Salmonella abony</i>	1.2	2.9	4.1	2.3	/
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	2.8	3.2	1.6	3.0	/
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1.1	3.1	2.65	2.4	0.6
<i>Bacillus ceureus</i>	1.5	3.0	0.6	3.5	/
<i>Bacillus subtilus</i>	3.8	3.8	3.6	3.9	/
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.6	3.1	3.95	2.6	/
<i>Listeria monocytogenes</i>	3.0	3.2	1.0	2.4	/
<i>Enterococcus faecalis</i>	2.2	1.5	0.6	1.5	/
<i>Micrococcus luteus</i>	4.0	3.5	4.8	2.7	/
<i>Saccharomyces cervisiae</i>	1.2	2.75	3.6	2.2	/
<i>Candida albicans</i>	1.9	2.9	1.9	3.1	/

HLS est homosérine lactanes

CTR est ceftriaxone

Par comparaison des résultats obtenus avec les antibiotiques de références, on constate que l'huile essentielle de l'espèce *Salvia officinalis* a donné la même zone d'inhibition avec l'antibiotique *Gentamicine* pour la souche bactérienne *Staphylococcus aureus* (D = 2.6 cm) et avec l'antibiotique *Erythromycine* pour la souche *Salmonella abony* (D = 1.2cm) et la souche *Bacillus ceureus* (D = 1.5cm). Cette huile essentielle a également montré la même zone d'inhibition avec l'antibiotique *HLS* vis-à-vis la souche bactérienne *Listeria monocytogenes* (D = 3.2cm) et *Enterococcus faecalis* (D = 1.5cm).

Par ailleurs, la comparaison de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de l'espèce *Rosmarinus officinalis* avec celle des antibiotiques a montré que cette huile a la même zone d'inhibition avec l'antibiotique gentamicine vis-à-vis la souche bactérienne *Escherichia coli* (D = 2cm). On observe aussi que la souche *Salmonella abony* a donné une valeur supérieur de la zone d'inhibition pour les deux huiles essentielles de deux espèces étudiées (D = 1.4 cm) à celle de l'antibiotique *Erythromycine* (D = 1.2cm). Le même résultat est enregistré pour les deux huiles essentielles (D = 3.6cm) avec l'antibiotique *HLS* (D = 3.2cm) vis-à-vis la souche bactérienne *Listeria monocytogenes*.

A propos de l'extrait éthanolique de l'espèce *Salvia officinalis*, les deux souches bactériennes *Agrobacterium tumefaciens* et *Listeria monocytogenes* ont données les mêmes zones d'inhibitions avec l'antibiotique *Erythromycine*, avec des diamètres d'inhibitions égales respectivement 1.6 cm et 1cm.

Par contre, l'extrait éthanolique de l'espèce *Rosmarinus officinalis* a montré la présence de la même zone d'inhibition avec l'antibiotique *CTR* sur la souche *Listeria monocytogenes* (D = 1cm) et la même zone d'inhibition avec l'antibiotique *Erythromycine* sur la souche bactérienne *Bacillus ceureus* (D = 1.6cm).

En conclusion, les huiles essentielles et les extraits éthanolique des deux plantes étudiées ont présentés une activité antibactérienne puissante vis-à-vis les bactéries à Gram positif testées comme *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*. Mais ils ont montrés une faible activité antibactérienne vis-à-vis les bactéries à gram négative comme *Escherichia coli* et *Agrobacteriumtumefaciens*.

Par ailleurs, Les huiles essentielles des deux espèces ont montrées une activité antifongique très importante sur les levures.

#### I.4. Concentration minimale inhibitrice

L'étude de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des huiles essentielles et des extraits éthanoliques des deux plantes étudiées, a été réalisée en utilisant quatre souches bactériennes. Les résultats obtenus en ( $\mu\text{l}/\text{mL}$  pour les huiles essentielles et  $\text{mg}/\text{ml}$  pour les extraits éthanoliques) sont regroupés dans les tableaux ci-dessous.

**Tableau 16 :** Concentrations minimales inhibitrices de l'huile essentielle de l'espèce *S. Officinalis*.

<i>S. Officinalis</i> [ $\mu\text{l}/\text{mL}$ ]	1	2	3	4	5	6	7
	SM	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	témoin
	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625	
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	-	-	-	-	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-	+
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	-	-	+
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	+	+	+	+

D'après les résultats du tableau 16, on remarque que l'huile essentielle de *S. officinalis* présente une assez bonne activité antibactérienne à travers des CMI plus tôt faible. On



constate également l'absence de la croissance de toutes les souches au niveau de la solution mère (SM) et des solutions diluées à 1/2 et à 1/4. Pour la souche *Agrobacterium tumefaciens*, elle est résistante à la dilution 1/16 avec une CMI de 6.25 µl/mL et pour *Escherichia coli*, elle est résistance à la dilution de 1/8 avec une CMI de 12.5 µl/mL. Par contre, on remarque que les souches *Bacillus subtilus* et *Staphylococcus aureus* sont avérées être les souches les plus sensibles sous l'action de l'huile essentielle avec une même valeur de CMI égale 1.562 µl/mL.

**Tableau 17 :** Concentrations minimales inhibitrices de l'huile essentielle de l'espèce *R. Officinalis*.

<i>R. Officinalis</i>	1	2	3	4	5	6	7
[µl/mL]	SM	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	Témoin
	20	10	5	2.5	1.25	0.625	
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	-	-	-	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	+	+
<i>Bacillus subtilus</i>	-	-	-	-	-	-	+
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	+	+	+	+

Les résultats du tableau 17, montre que l'huile essentielle de *R. officinalis* présente aussi une bonne activité antibactérienne, car on observe l'absence de la croissance de toutes les souches au niveau de la solution mère, ainsi qu'aux solutions diluées à 1/2 et à 1/4. La souche *Bacillus subtilus* est avérée être la souche la plus sensible avec une CMI de 0.625 µl/mL, suivi de *Staphylococcus aureus* avec une CMI de 1.25 µl/mL à la dilution 1/32. En fin, les souches *Agrobacterium tumefaciens* et *Escherichia coli* sont résistantes à la dilution 1/8 avec une CMI de 5µl/mL.

**Tableau 18 :** Concentrations minimales inhibitrices de l'extrait éthanolique de l'espèce *S. Officinalis*.

<i>S. Officinalis</i>	1	2	3	4	5	6	7
[mg/mL]	SM	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	Témoin
	30	15	7.5	3.75	1.875	0.9375	
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	-	-	-	-	-	+	+
<i>Bacillus subtilus</i>	-	-	-	-	-	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-	+
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+	+	+

En ce qui concerne l'extrait éthanolique de *S. officinalis*, les résultats obtenus montrent une assez bonne activité antibactérienne à travers des CMI plus tôt faible. A l'exception de la



souche *Escherichia coli*, on constate l'absence de la croissance des souches *Agrobacterium tumefaciens*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* au niveau de la solution mère (SM) et des solutions diluées à 1/2, à 1/4, à 1/8 et à 1/16. On remarque aussi que la souche *Agrobacterium tumefaciens* est résistante à la dilution 1/32 avec une CMI de 1.875 µl/mL et que les souches *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* sont avérées être les souches les plus sensibles sous l'action de l'extrait éthanolique avec une même valeur de CMI égale 0.9375 µl/mL.

**Tableau 19 :** Concentrations minimales inhibitrices de l'extrait éthanolique de l'espèce *S. Officinalis* de la souche bactérienne *Escherichia coli*.

<i>S. Officinalis</i>	1	2	3	4	5	6	7
[mg/mL]	SM	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	Témoin
	40	20	10	5	2.5	1.25	
<i>Escherichia coli</i>	-	+	+	+	+	+	+

On constate l'absence de la croissance de la souche bactérienne *Escherichia coli* au niveau de la solution mère, elle est résistante à la dilution 1/2 avec une CMI 40mg/ml.

**Tableau 20 :** Concentrations minimales inhibitrices de l'extrait éthanolique de l'espèce *R. Officinalis*.

<i>R. Officinalis</i>	1	2	3	4	5	6	7
[mg/mL]	SM	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	Témoin
	30	15	7.5	3.75	1.875	0.9375	
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	-	-	-	-	-	+	+
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	-	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+	+	+

En fin, les mêmes résultats de l'étude de la CMI de l'extrait éthanolique de l'espèce *Salvia officinalis* sont enregistré pour celui de l'espèce *Rosmarinus officinalis* vis-à-vis les souches *Agrobacterium tumefaciens* et *Escherichia coli*. On remarque aussi que la souche *Staphylococcus aureus* est résistante à la dilution 1/16 avec une CMI de 3.75 µl/mL et que la souche *Bacillus subtilis* est résistante à la dilution 1/32 est avec une CMI égale 1.875 µl/mL.

**Tableau 21 :** Concentrations minimales inhibitrices de l'extrait éthanolique de l'espèce *R. Officinalis* de la souche bactérienne *Escherichia coli*.

<i>R. Officinalis</i>	1	2	3	4	5	6	7
[mg/mL]	SM	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	Témoin
	40	20	10	5	2.5	1.25	
<i>Escherichia coli</i>	-	+	+	+	+	+	+

On remarque l'absence de la croissance de la souche bactérienne *Escherichia coli* au niveau de la solution mère, elle est résistante à la dilution 1/2 avec une CMI 40mg/ml.

### I.5. Evaluation de l'association des deux huiles essentielles et des deux extraits éthanoliques de *S. officinalis* et *R. officinalis*

Les études de combinaison de substances médicinales en général, et antibiotiques en particulier, sont de plus en plus souvent décrites dans la littérature [90]. Cette stratégie est en effet d'un grand intérêt en diminuant la dose de composé utilisé [90], limitant ainsi également de développement des phénomènes de résistances.

Dans cette partie de ce travail, nous avons étudié l'effet de l'association des deux huiles essentielles et des deux extraits éthanoliques de *Salvia officinalis* et de *Rosmarinus officinalis* sur quatre souches bactériennes à savoir ; *Agrobacterium tumefaciens*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *Escherichia coli*, en calculant le Fraction de Concentration Inhibitrice. FIC index par la relation suivante :

$$FIC (A) = \frac{CMI(A)m}{CMI(A)s}$$

$$FIC (B) = \frac{CMI(B)m}{CMI(B)s}$$

$$FIC = FIC (A) + FIC (B)$$

les résultats de leurs associations sont représentés dans le tableau suivant :

**Tableau 22 :** Résultat de l'association de deux huiles essentielles de *S. officinalis* et *R. officinalis*

Souche bactérienne	CMI d'HE (S.O) (µl/mL)	CMI d'HE (R.O) (µl/mL)	FIC index (µl/mL)
<i>Agrobacteriumtumefaciens</i> (A)	6.25	5	1
<i>Staphylococcus aureusse</i> (B)	1.562	1.25	0.25
<i>Bacillus subtilus</i> (C)	1.562	0.625	0.25
<i>Escherichia coli</i> (D)	12.5	5	>4



L'effet de l'association des deux huiles essentielles de *S. officinalis* et *R. officinalis* montre un effet synergique ( $FIC\ index = 0.25 \leq 0.5$ ) contre les deux souches bactériennes *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* et un effet d'addition ( $0.5 < FIC = 1 \leq 1$ ) contre *Agrobacterium tumefaciens* et un effet antagonisme ( $FIC > 4$ ) contre *Escherichia coli* car la croissance de la souche s'était dans tout les dilutions.

**Tableau 23** : Résultat de l'association de deux extraits éthanoliques de *S. officinalis* et *R. officinalis*

Souche bactérienne	CMI d'EE (S.O) (mg/mL)	CMI d'EE (R.O) ( mg/mL)	FIC index (mg/mL)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (A)	1.875	1.875	0.75
<i>Staphylococcus aureus</i> (S)	0.9375	3.75	0.375
<i>Bacillus subtilis</i> (B)	0.9375	1.875	0.25
<i>Escherichia coli</i> (E)	40	40	>4

L'effet de l'association de l'extrait éthanolique de l'espèce *S. officinalis* et l'extrait éthanolique de l'espèce *R. officinalis* donne un effet d'addition ( $0.5 < FIC = 0.75 \leq 1$ ) contre *Agrobacterium tumefaciens*, un effet synergique ( $FIC\ index = 0.25 \leq 0.5$ ) contre *Bacillus subtilis* et un autre effet synergique ( $FIC\ index = 0.375 \leq 0.5$ ) contre *Staphylococcus aureus*. Les deux mélanges des huiles et des extraits faisaient inhiber l'action antibactérienne de l'un de ces huiles ou ces extraits et un effet antagonisme ( $FIC > 4$ ) contre *Escherichia coli*.

L'huile essentielle de l'espèce *S. officinalis* a montrée une activité meilleure en association avec l'huile essentielle de *R. officinalis* sur les deux bactéries testées *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*.

Un des ces huiles essentielles inhibe la croissance de la souche bactérienne *Agrobacterium tumefaciens*.

La combinaison des deux extraits éthanoliques a montrée aussi une bonne activité antibactérienne avec concentration plus faible contre *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*, et l'un de ces extraits affecte sur la croissance de la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*.

Chacune des huiles essentielles et des extraits éthanoliques de *S. officinalis* et *R. officinalis* ont une activité antibactérienne contre *Escherichia coli*, l'association de ces deux huiles et extraits a désactivée cette activité.



## Conclusion générale

Le présent travail a été consacré à l'étude des huiles essentielles et des extraits des extraits de deux espèces *Salvia officinalis* et *Rosmarinus officinalis* récoltées à Chréa dans la région de Blida en Avril 2018.

Le rendement de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* obtenues par hydrodistillation (0.6%), est conforme avec les normes AFNOR.

L'analyse GC et GC/MS de l'huile essentielles de l'espèce *Salvia officinalis* a montré que cette huile est majoritairement composée de Gurjunene (20.29%) et biformene (19.59%), et l'analyse de l'huile essentielle de l'espèce *Rosmarinus officinalis* a présentée les composés majoritaires suivants : camphre (15.69%), 1.8-cineol (15.42%), borneol (11.15%),  $\alpha$ -pinène (8.53%) et verbenone (7.19%).

L'effet antimicrobien des deux huiles essentielles et des deux extraits, est mis en évidence par la méthode de diffusion sur disque et la méthode des puits, en présence de dix bactéries pathogènes: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aenuginosa*, *Pseudomonas aenuginosa*, *Bacillus subtilus*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella abony*, *Bacillus ceureus*, *Micrococcus luteus* et deux levures *Saccharomyces cervisiae* et *Candida albicans*. Ils ont montrés une activité puissante vis-à-vis les bactéries à gram positive et les levures et une faible activité vis-à-vis les bactéries à gram négative.

La potentialisation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Salvia officinalis* et *Rosmarinus officinalis* a été réalisée au cours de cette étude. Nous avons en particulier pu montrer que l'association des huiles essentielles et les extraits éthanoliques de ces deux plantes permettaient de réduire considérablement les CMI des huiles et des extraits et donc de potentialiser leur activité antibactérienne.

## References

- [1] Duarte, M. R., & Lopez, J. F, 2007, Stem and leaf anatomy of *Plectranthus neochilus* Schltr., Lamiaceae. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* , 17 (4), pp. 549-556.
- [2] Gherman C, Culea M, Cozar O, 2000, Comparative analysis of some active principles of herb plants by GC/MS. 53 :253-62.
- [3] Miller RE, Mc Conville MJ, Woodrow IE. 2006. *Phytochemistry*. 67 : 43-51.
- [4] Quezel P., Santa S,1963, *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*, Ed., CNRS, Paris, Tom 2 :793.
- [5] Naghibi F., Mosaddegh M., Mohammadi Motamed S ., Ghorbani A; 2005; Labiatae family in folk medicine in Iran: from ethnobotany to pharmacology; *Iran, J. Pharm. Res.* 2, 63-79.
- [6] Bruneton J ,2001, *Plantes toxiques : végétaux dangereux pour l'homme et les animaux* ; 2<sup>ème</sup> Ed : TEC & DOC. Paris. 337 p.
- [7] Alice T., Mariella L., Rita M., Haana M., Tania S., Paolo V., Anna M., Alberto P; 2016; Lamiaceae phenols as multifaceted compounds: bioactivity, industrial prospects and role of “positive-stress”. *Industrial Crops and Products*; 83: 241-254.
- [8] Karousou R., Hanlidou E., Kokkini S; 2000; The sage plants of greece: distribution and infraspecific variation, Dans E. K. Spiridon, SAGE: *The genus Salvia* (pp. 27-46). Athens, Greece: Overseas Publishers Association.
- [9] Scully, R,2008, *Key To Lamiaceae Of Colorado (Mint Family)*. Colorado, USA: Univ Colorado Press..
- [10] Pistelli L,2006, Photochemicals from lamiaceae: from nutraceuticals to Hallucinogens. International symposium The Labiatae: Advances in Production, Biotechnology and Utilization, Sanremo, Italy: 22-25 February.
- [11] Walker, J. B., Kenneth, J., Treutlein, J., & Wink, M; 2004; *Salvia* (Lamiaceae) is not monophyletic: Implications for the systmatics, radiation, and ecological pecializations of *Salvia* and tribe Mentheae; *American Journal of Botany*; 91 (7), pp. 1115–1125.
- [12] Iserin P., 2001, *Encyclopédie des plantes médicinales*, Larousse VUEF, 2<sup>ème</sup> Ed.14. Paris; 335p.
- [13] Bahadori M., Valizadeh H., Asghari B., Dinparast L., Moridi F.M; 2015; Shahram Bahadori f Chemical composition and antimicrobial, cytotoxicity, antioxidant and enzyme inhibitory activities of *Salvia spinosa* L. *Journal of Functional Foods*, 18 : 727-736.



- [14] Li M., Li Q., Zhang C., Zhang N., Cui Z., Huang L., Xiao P; 2013; An ethnopharmacological investigation of medicinal *Salvia* plants (Lamiaceae) in China. *Acta Pharmaceutica Sinica B.*, 3: 273-280
- [15] Kamatou G.P.P., Vanzyl I., Vanvuuren S.F., Figueirido ., Barroso G., Pedro., Viljoen; 2008; Seasonal Variation in essential oil composition; oil toxicity and the biological activity of solvent extracts of three south African *Salvia* Species. *South African* ; 74:230-237.
- [16] Miller ; 1785; Dictionnaire des jardiniers: contenant les méthodes les plus sûres . 8ème Ed . paris. 647p.
- [17] Kotan A.C.R., Kordali S., Kesdek M., Kaya Y., Kilic H; 2008; Antimicrobial and insecticidal activities of essential oil isolated from Turkish *Salvia hydrangea* DC, ex Benth, *Biochemical Systematics and Ecology*; 36: 360- 368.
- [18] Abdulhamid A., Giweli1 A.M., Dzamic M.S., Ristic M.S., Janackoovic P., Marin P.D; 2013; The chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of *salvia fruticosa* growing wild in Libya. *Arch. Biol. Sci., Belgrade*; 65 (1):321- 329.
- [19] Siebert D. J; 1994; *Salvia divinorum* and *Salvinorin A*: new pharmacologic findings, *Journal of Ethnopharmacology*, 43: 53-56.
- [20] Ozenda P., 1977.- Flore du Sahara. 2em ED. CNRS. Paris
- [21] Anačkov G., Boža P., Božin B., Igić R., Jovanović M., Merkulov L., Mimica-Dukić N., Vukov D., Zorić L., 2005, Chemical Composition of Essential Oil and Leaf Anatomy of *Salvia bertolonii* Vis. and *Salvia pratensis* L. (Sect. *Plethiosphace*, Lamiaceae). *Molécules*, Vol.14:1-9.
- [22] Eberhard.T, Robert. A, Annelise. L. plantes aromatiques p. 444, 445, 446
- [23] Cronquist; 1968; the evolution and classification of flowering plants; 396p.
- [24] djerroumi A. Nacef M ; 2004 ;100 plantes medicinales d'Algerie ;Ed palais du livre ;P135-131
- [25] Radulescu V., Silvia C., Eliza O; 2004; capillary gas chromatography-mass spectrometry of volatile and semi volatile compound of *salvia officinalis*, *journal of chromatography A*, vol 1027, p.p 121-126.
- [26] Duke J A., Bogenschutz-godwin du cellier M J., et Duke P A K; 2002; Medicinal Herbs. Edition CRC Press LLC.P:201
- [27] Iserin P ;2001 ;Encyclopédie des plantes médicinales ; Larousse VUEF, 2ème Ed.14. Paris.335p.



- [28] Baricevic, D., & Bartol, T ; 2000 ; Pharmacology: The biological/pharmacological activity of the *Salvia* genus. Dans E. K. Spiridon; SAGE: The genus *Salvia* (pp. 143-184). Athens, Greece: Overseas Publishers Association.
- [29] Balouiri Mounyr, 2011, Mémoire de fin d'études, Contribution à l'étude de l'activité antibactérienne de trois extraits de Plantes Médicinales et Aromatiques cultivées dans le jardin de l'institut national des plantes médicinales et aromatiques –Taounate .
- [30] Z. Djarmati, R.M. Jankov, A. Djordjevic, B. Ribar, D. Lazar, P. Engel; 1992; *Phytochemistry*; 31;1307.
- [31] K. Miura, H. Kikuzaki, N. Nakatani, *J. Agric*; 2002; and *Food Chem*; 50; 1845
- [32] Oliveira K.B., Palué., Weffort-Santos A.M., Oliveira B.H; 2013; Influence of rosmarinic acid and *Salvia officinalis* extracts on melanogenesis of B16F10 cells. *Braz. J. Pharmacogn.* 23 (2): 249-258
- [33] M. Wang, H. Kikuzaki, N. Zhu, S. Sang, N. Nakatani, C.T. Ho; 2000; Isolation and structural elucidation of two new glycosides from sage (*Salvia officinalis* L.); *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 48, 235-238.
- [34] Cuvelier, H. Richard, C. Berset; 1996; Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary; *Journal of the American Oil Chemists Society*; 73, 645-652.
- [35] Y. Lu, L.Y. Foo; 2001; Salvianolic acid L, a potent phenolic antioxidant from *Salvia officinalis* ; *Tetrahedron Letters*; 42, 8223-8225.
- [36] M. Wang, J. Li, M. Rangarajan, Y. Shao, E.J. La Voie, T.C. Huang, C.T. Ho; 1998; Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*); *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 46, 4869-4873.
- [37] I. Masterova, D. Uhrin, V. Kettmann, V. Suchy; 1989; Phytochemical study of *Salvia officinalis* L ; *Chemical Abstracts* (112, 731917v); *Chemical Papers*; 43, 797-803;.
- [38] Y. Lu, L.Y. Foo; 2000; Flavonoid and phenolic glycosides from *Salvia officinalis*; *Phytochemistry*; 55, 263-267.
- [39] Bruneton J ; 1999 ; Pharmacognosie phytochimie plantes médicinales. 3e édition Tec et Doc, Paris
- [40] P.C. Santos-Gomes, M.F. Ferreira, *J. Agric. Food. Chem*; 2001; 49; 2908.
- [41] M. Couladis, O. Tzakou, N. Mimica-DuckiY, R. Jancic, D. Stojanovic, *Flavour. Frag. J.*, 2002, 17, 119
- [42] E. Tsankova, A. N. Konaktchiev, E.M. Genova, *J. Essent. Oil. Res.*, 1994, 6, 375
- [43] L. Pace, R. Piccaglia, *J. Essent. Oil. Res.*, 1995, 7, 443

- [44] S. Fellah, M. Romdhane, M. Abderraba; 2006; Extraction et étude des huiles essentielles de la *Salvia officinalis* cueillie dans deux régions différentes de la Tunisie; Journal de la société algérienne de chimie, 16(2), 193-202
- [45] Taleb-toudert karima ; 2015 ; mémoire de doctorat, extraction et caractérisation des huiles essentielles de dix plantes aromatiques provenant de la région kabylie (nord Algérie). Evaluation de leurs effets sur la bruche du niébé *callosobruchus maculatus*
- [46] H. Lakhal, H. Ghorab, S. Chibani, A. Kabouche, Z. Semra, F. Smati, S. Abuhamdah, Z. Kabouche; 2013; Chemical composition and biological activities of the essential oil of *Salvia officinalis* from Batna (Algeria); Der Pharmacia Lettre; 5 (3),310-314
- [47] A. Angioni, A. Barra, E. Cereti, D. Barile, J. D. Coisson, M. Arlorio, S. Dessi, V. Coroneo et P. Cabras. J. Agric, 2004, Food Chem. Vol. 52. 3530-3535.
- [48] Henrich, 2006, et al. Ethnobotany and Flavonoids-potent and versatile.
- [49] <https://fr.wikipedia.org/wiki/Rosmarinus>.
- [50] Gonzalez-Trujano, M.E., Pena, E.I., Martinez, A.L., Moreno, J., Guevara-Fefer, P., Deciga-Campos, M., Lopez-Munoz, F.J, 2007, Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmarinus officinalis* L. using three different experimental models in rodents. *J Ethnopharmacol.* 111: 476-482.
- [51] Miara M.D., Bendif H., Rebbas K., Bounar R., Ait Hammou M, Maggi F.2017. Medicinal plants and their traditional uses in the highlands region of Bordj Bou Arreridj (Northeast Algeria). *Journal of Ethnopharmacology* (In the process of submitting).
- [52] Heinrich, M., Kufer, J., Leonti, M., Pardo-de-Santayana, M. 2006, Ethnobotany and ethnopharmacology-Interdisciplinary links with the historical sciences. *J Ethnopharmacol.* 107: 157-160.
- [53] Aruoma O. I., Spencer J. P., Rossi R., Aeschbach R., Khan A., Mahmood N., Munoz A., Murcia A., Butler J., Halliwell B. 1996. An evaluation of the antioxidant and antiviral action of extracts of Rosemary and provençal herb. *Food and Chemical Toxicology.* Vol.34, n.5, p.449-456.
- [54] <http://nature.jardin.free.fr/>
- [55] <https://fr.wikipedia.org/wiki/Romarin>
- [56] <http://www.doctissimo.fr/html/sante/phytotherapie/plante-medicinale/romarin.htm>
- [57] Makhloufi .A ; « Etude des activités antimicrobienne et antioxydants de deux plantes médicinales poussant à l'état spontané dans la région de Bechar (*matricaria pubescens* (desf.) Et *Rosmarinus officinalis* l) et leur impact sur la conservation des dattes et du beurre cru » ; thèse de doctorat ; université d'Aboubaker belkaid.



- [58] Henrich, 2006, et al. Ethnobotany and Flavonoids-potent and versatile.
- [59] P. Iserin, M. Masson, J-P. Restellini, 2001, Encyclopedia of Medicinal Plants (2nd Edition). P. 128 .
- [60] Arnold, N., Valentini, G., Bellomaria, B., Laouer, H, 1997 ,Comparative study of the essential oils from *Rosmarinus eriocalyx* Jordan & Fourr. from Algeria and *R. officinallis* L. from other countries. *J.essent.Oil Res.* **9**: 167-175.
- [61] Nassu, R.T., Guaraldo Goncalves, L.A., Azevedo Pereira da Silva, M.A., Beserra, F.J, 2003, Oxidative stability of fermented goat meat sausage with different levels of natural antioxidant. *Meat Science.* **63**: 43-49.
- [62] Rasooli, I., Fakoor, M.H., Yadegarinia, D., Gachkar, L., Allameh, A., Rezaei, M.B, 2008, Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum* L. essential oils. *International J of Food Microbiology.* **122**:135-139.
- [63] Georgantelis, D., Ambrosiadis, I., Katikou, P., Blekas, G., Georgakis, S A. ,2007, Effect of rosemary extract, chitosan and  $\alpha$ -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4 °C. *Meat Science.* **76**: 172-181.
- [64] Arnold, N., Valentini, G., Bellomaria, B., Laouer, H, 1997, Comparative study of the essential oils from *Rosmarinus eriocalyx* Jordan & Fourr. from Algeria and *R. officinallis* L. from other countries. *J.essent.Oil Res.* **9**: 167-175.
- [65] Offord E. A., Macé K., Ruffieux C., Malnoë A. et Pfeifer A. M. 1995. Rosmary components inhibit benzo [a] pyrene-induced genotoxicity in human bronchial cells. *Carcinogenesis.*, **16** (9) : 2057-2062.
- [66] C. L. Canterll. S. L. Richheimer, G. M. Nicholas, B. K. Schmidt, et D. T. Bailey. J. Nat. Prod, 2005, Vol. 68. 98-100,.
- [67] Zoubeidi.C ; 2004 ; Etude des antioxydants dans le *Rosmarinus officinalis* .Labiatea ; thèse de magistère ; université de Ouargla.
- [68] Zeghad.N ; 2009 ; Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne ; thèse de magistère, université de Mentouri ; Constantine .
- [69] Faweett, C. H and D. M, 1970, Spencer: Plant chemotherapy with natural products. Ann. Rev. Phytopath., 8, 403-408.
- [70] Mahadevan, A, 1982, Biochemical aspects of plant disease resistance. Today and Tomorrow Printers and Publishers, New Delhi.
- [71] <https://www.futura-sciences.com/sante/definitions/biologie-micro-organisme-6183/>
- [72] <https://fr.wikipedia.org/wiki/Antimicrobien>



- [73] Prescott LM, Harley JP, Klein DA ,1995, Microbiologie. De Boeck ed. p 1014
- [74] <http://www.antibiotique.eu/le-mode-daction.html>
- [75] Perry J., Staley J., Lory S., 2004, Microbiologie. Collection: Sciences Sup, Dunod, 912p.
- [76] Juliano, C A., Mattana, and M., Usai, 2000, Composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus herba-barona* Loisel growing wild in Sardinia. *Journal of Essential Oil Research* 12:516-522.
- [77] Assaf, M. H., A. A. Ali, M. A. Makboul, Beck J. P. & Anton. R, 1987, Preliminary study of phenolic glycosides from *Origanum majorana*; quantitative estimation of arbutin; cytotoxic activity of hydroquinone. *Planta Medica*, 53, 343–345.
- [78] Zaikal. L, 1988, Spices and Herbs - Their antimicrobial activity and its determination. *J Food Safety*; 9(2): 97-118.
- [79] Auboyer. C. drugeon. H, f. gouin., 1999, association d'antibiotiques ou monothérapie en réanimation chirurgicale et en chirurgie. *conférence d'experts*.
- [80] Bricaire, F., 1997. Pourquoi une association antibiotique ? *Réanimation Urgences*, 6 (4, Part 3), 3s-8s.
- [81] Cattoir, D V, 2006, < Bacterio 15. pdf > étude in vitro de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques. *Cours de DCEMI - Faculté de Médecine de Créteil*.
- [82] Archambaud, M., 2009, Méthodes d "évaluation de l "activité des antibiotiques in vitro. *Laboratoire Bactériologie-Hygiène, CHU Rangueil Toulouse*.
- [83] Mainardi J L, 1997, Associations d'antibiotiques pour le traitement des infections/*Staphylococcus aureus*. *Méd Mal Infect*. 224.
- [84] Denis François., maris cécile poly., christian martin., edouard bingen., roland quentin ,2007, page 544- 554.
- [85] S. Krishnan, E.K. Manavathu, P.H. Chandrasekar, 2009. ; "Aspergillus flavus : an emerging non-fumigatus Aspergillus species of significance". *Mycoses* ; 52: 206-222.
- [86] Ponce A.G., Fritz R., del Valle C.E., Roura S.I., 2003, Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 36: 679–684.
- [87] Laura L. Zaika., 1988. ; "SPICES AND HERBS : THEIR ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND ITS DETERMINATION". *Journal of Food Safety*, Wiley Online Library.
- [88] <http://www.memoireonline.com/05/14/8874/Etude-de-sensibilite-de-streptococcus-mutans-aux-extraits-totaux-de-khaya-nyasica7.png>.
- [89] Afnornft 75-006, huile essentielle. association française de normalisation. Paris. pp559-563.

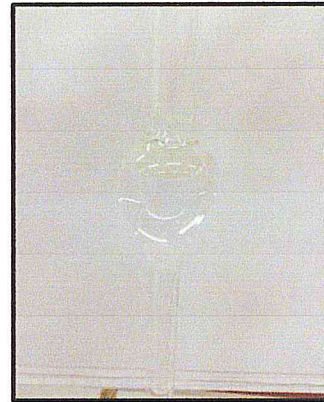
[90] Rosato, A., Piarulli, M., Corbo, F., Muraglia, M., Carone, A., Vitali, M. E. et Vitali, C. ,2010, In vitro synergistic action of certain combinations of gentamicin and essential oils. *Current medicinal chemistry*, 17(28) : 3289-3295.

# Annexe

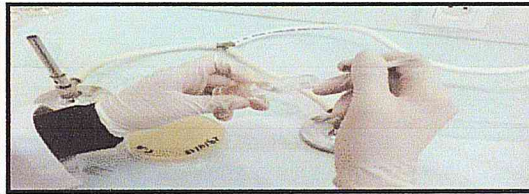
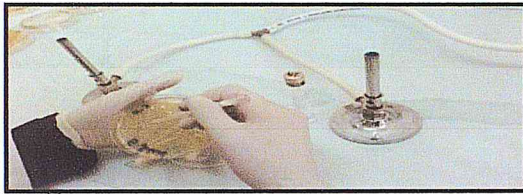




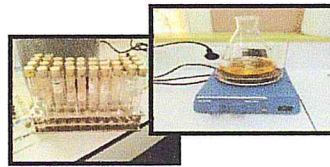
**Figure :** huile essentielle *S.officinalis*



**Figure :** huile essentielle *R.officinalis*



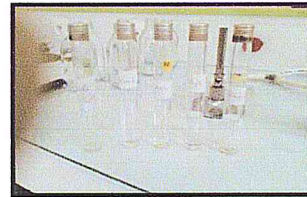
**Figure:** Inoculum des différentes souches microbiennes.



**Figure :** préparation de milieu de culture



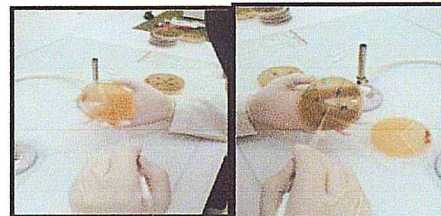
**Figure:** solutions des pré-cultures.



**Figure :** les suspensions bactériennes

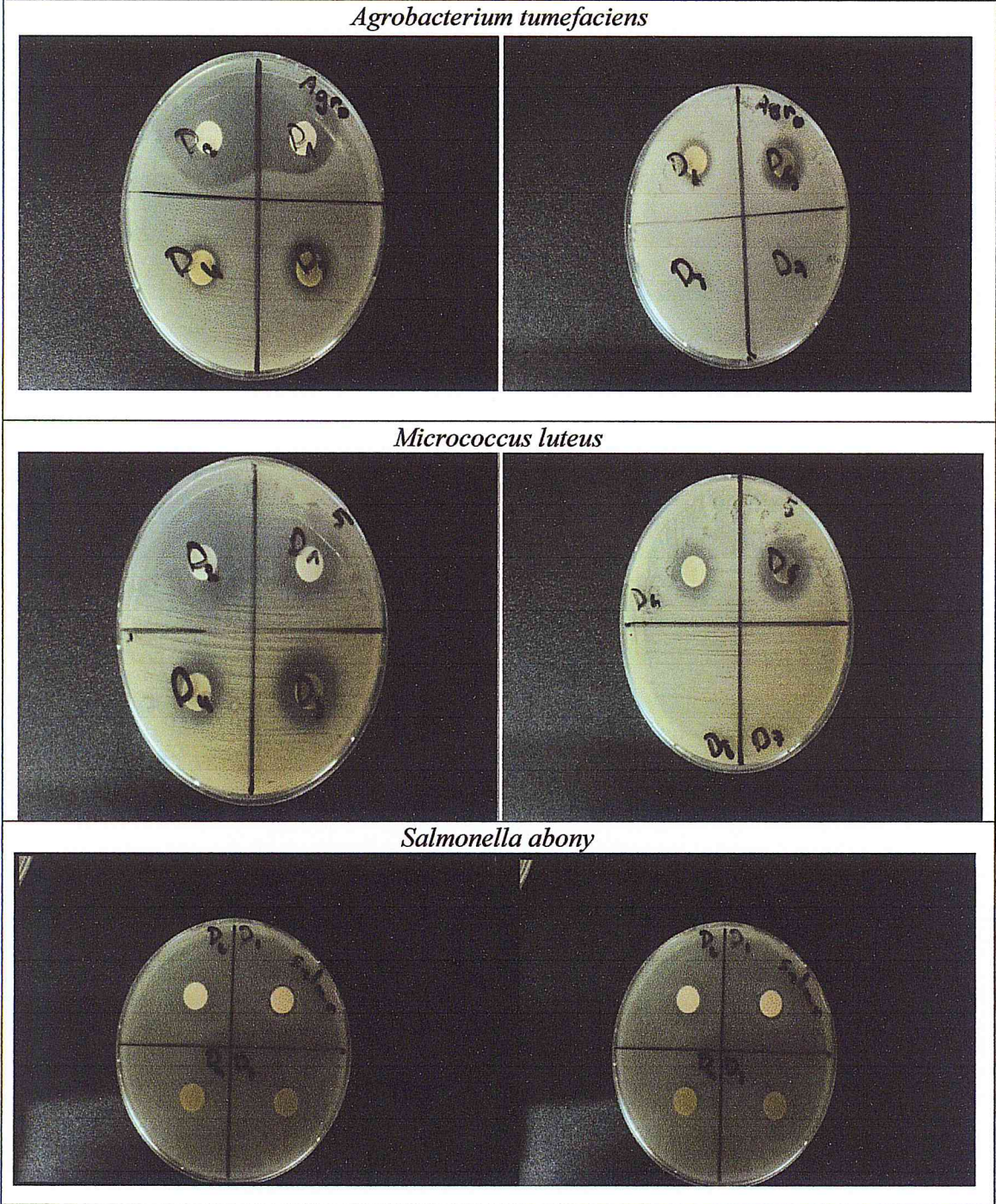


**Figure :** préparation des extraits ethanologique.



**Figure :** Ensemencement microbienne

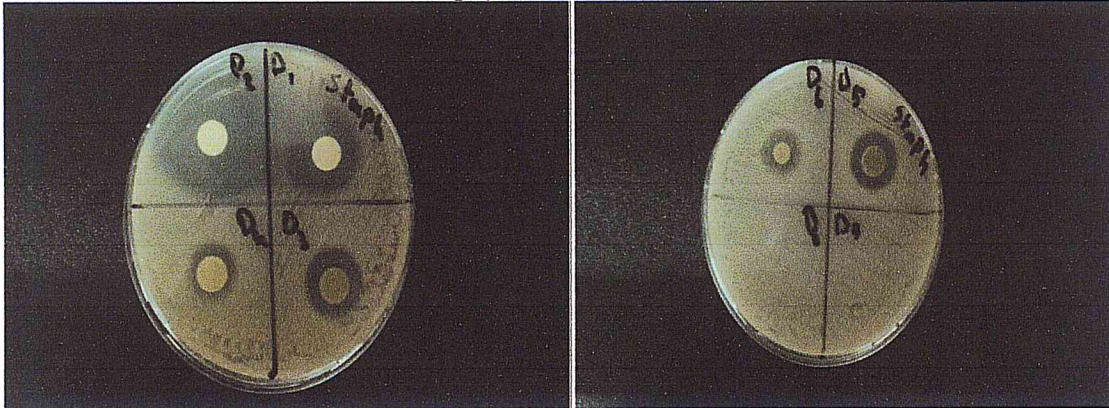




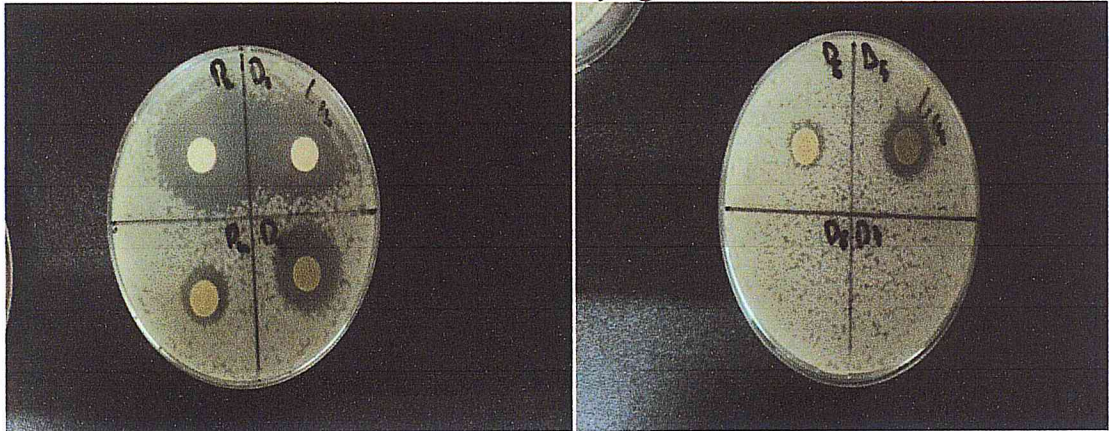
**Figure :** l'activité antimicrobienne des HEs et des EEs de l'espèce *S. officinalis* et *R. officinalis*.



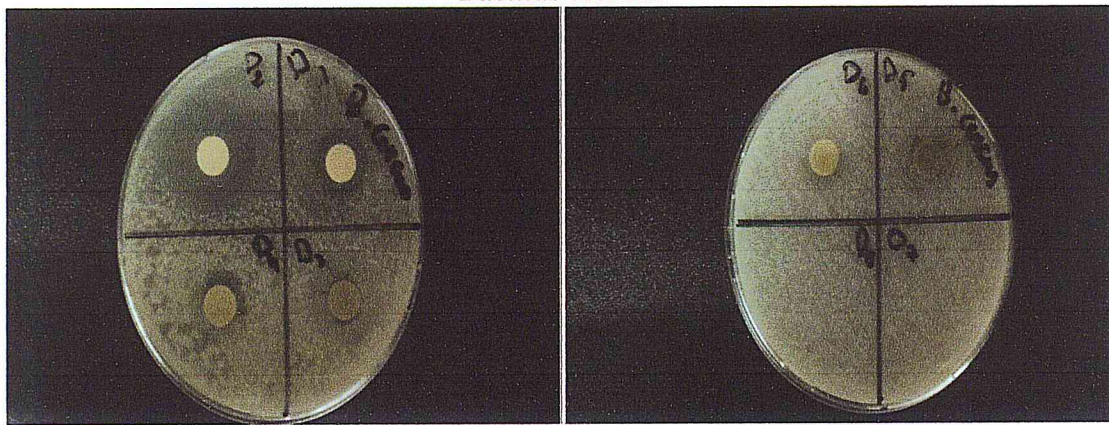
*Staphylococcus aureus*



*Listeria monocytogenes*

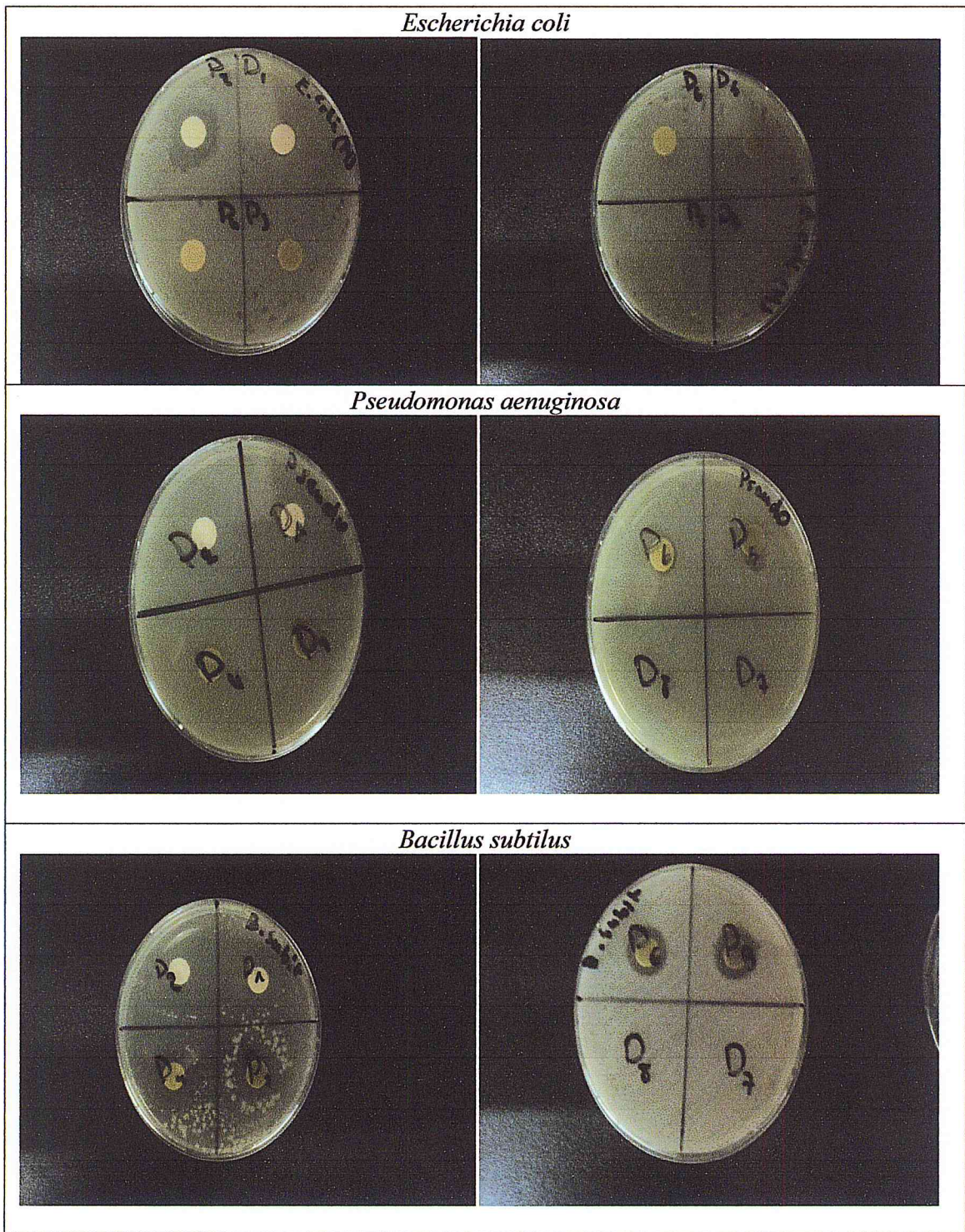


*Bacillus ceureus*



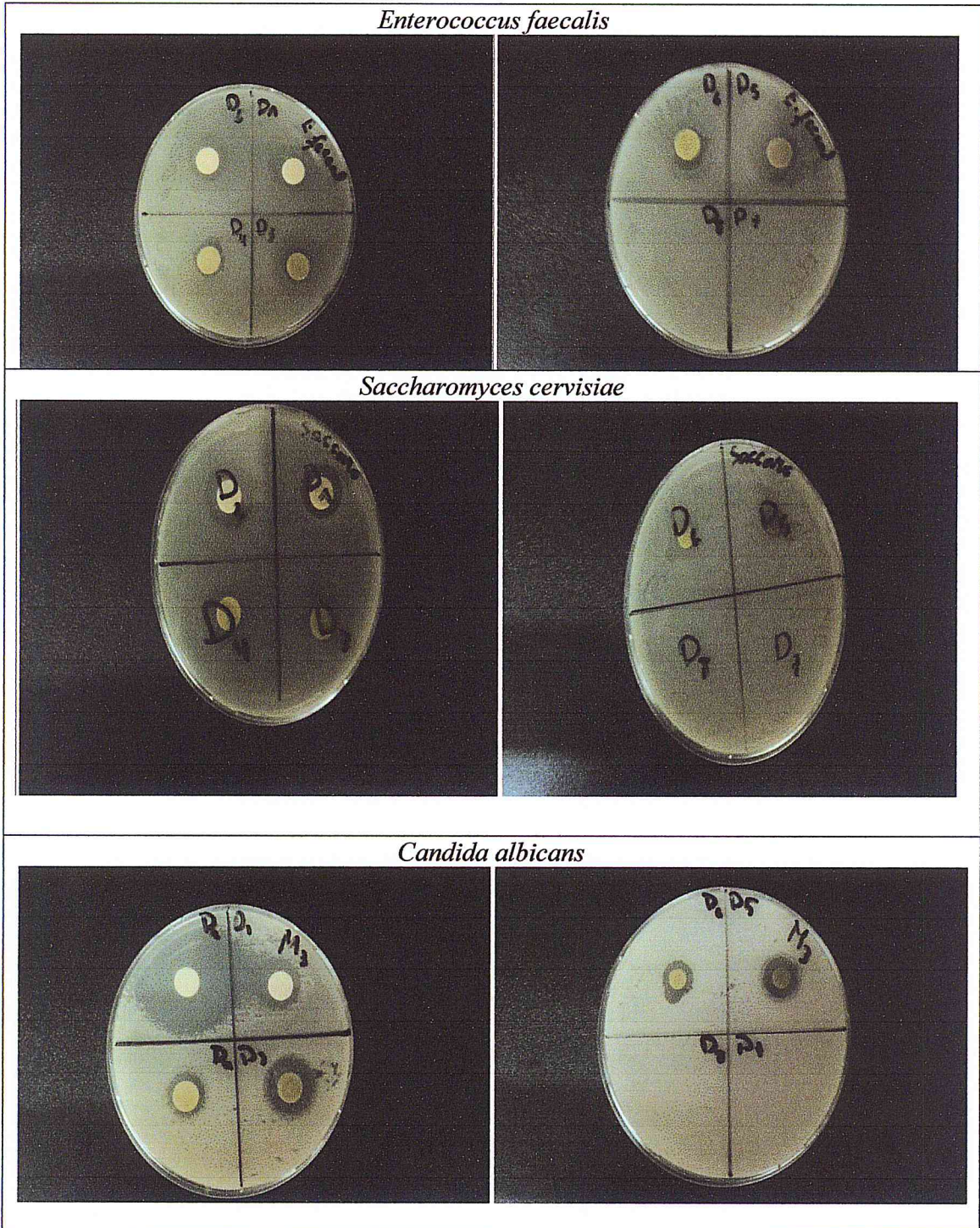
**Figure :** l'activité antimicrobienne des HEs et des EEs de l'espèce *S. officinalis* et *R. officinalis*.





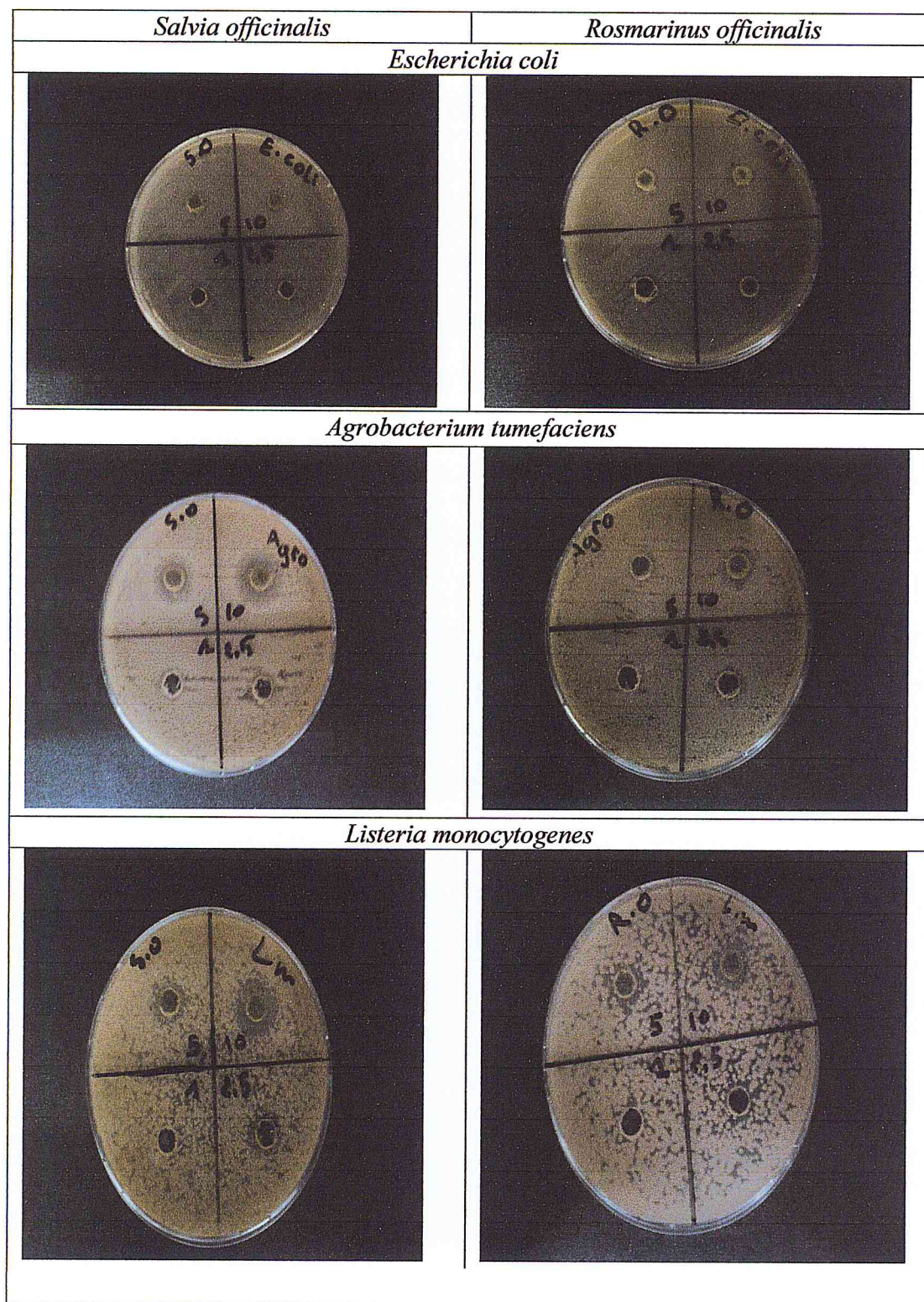
**Figure :** l'activité antimicrobienne des HEs et des EEs de l'espèce *S. officinalis* et *R. officinalis*.





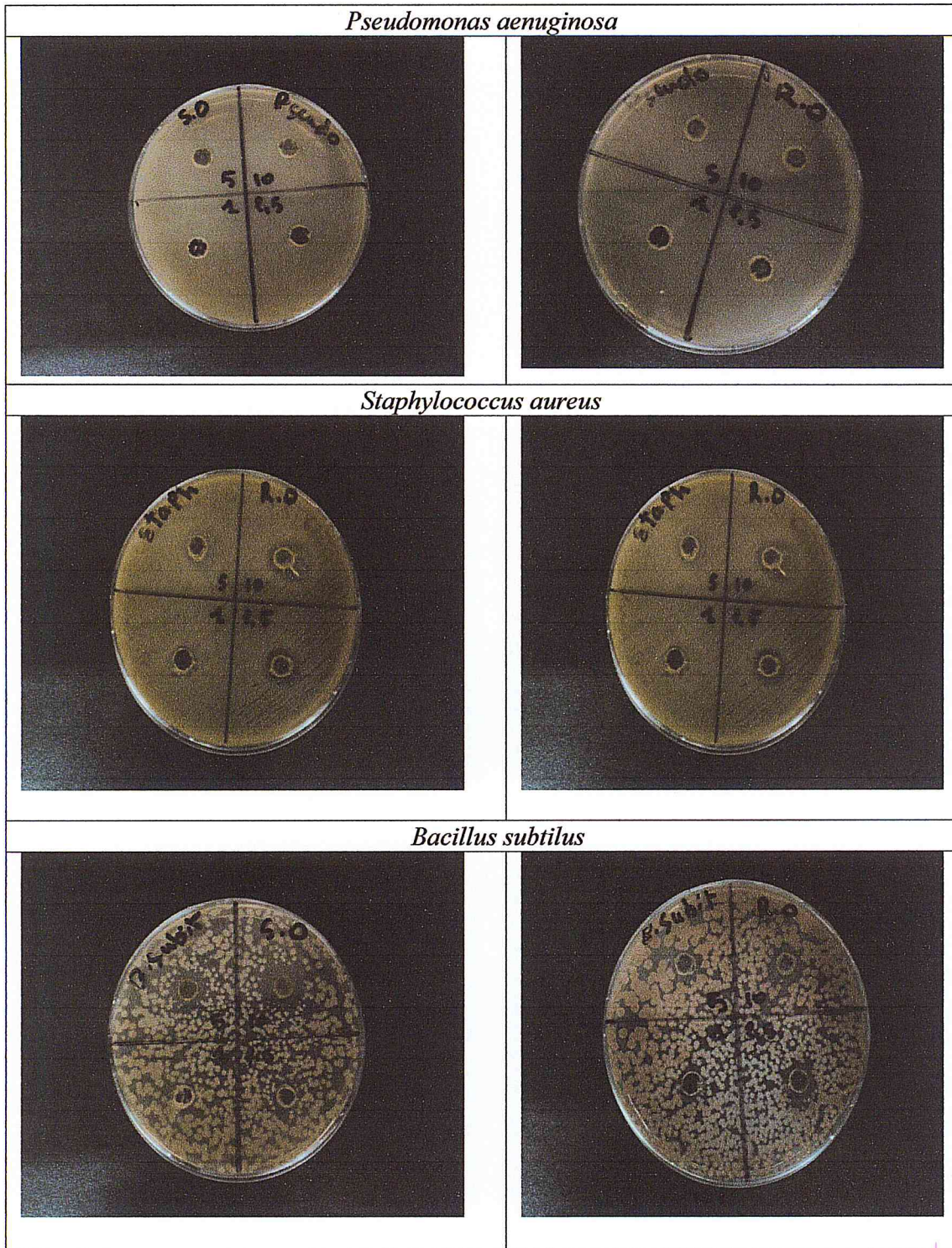
**Figure :** l'activité antimicrobienne des HEs et des EEs de l'espèce *S. officinalis* et *R. officinalis*.





**Figure :** l'activité antimicrobienne de l'EES de l'espèce *S. officinalis* et *R. officinalis*.

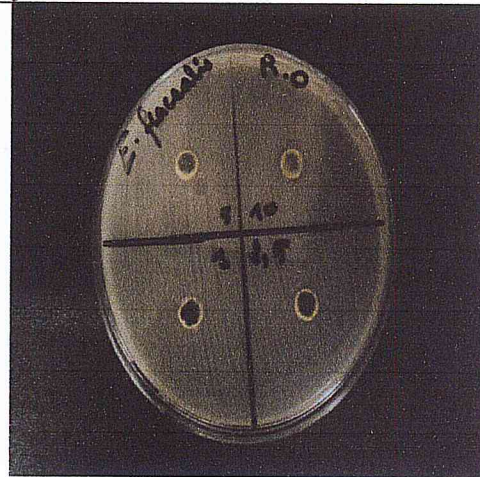
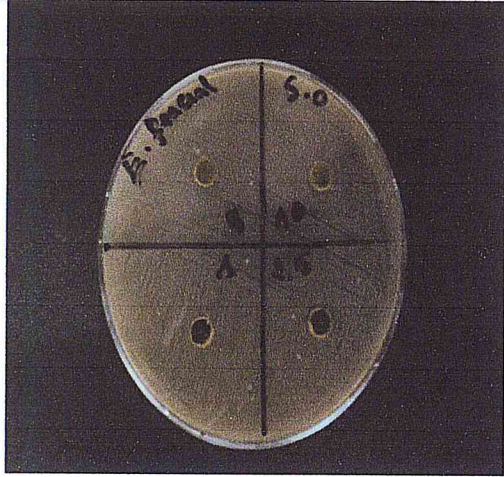




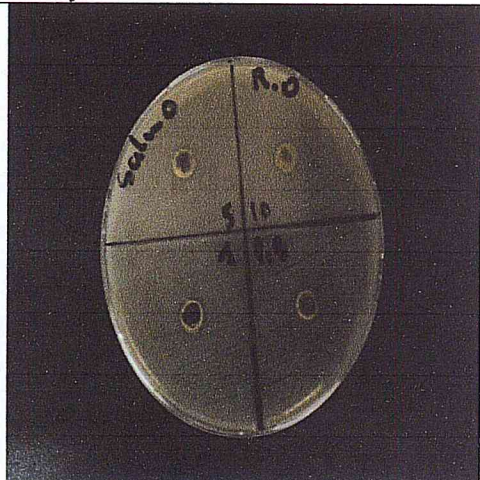
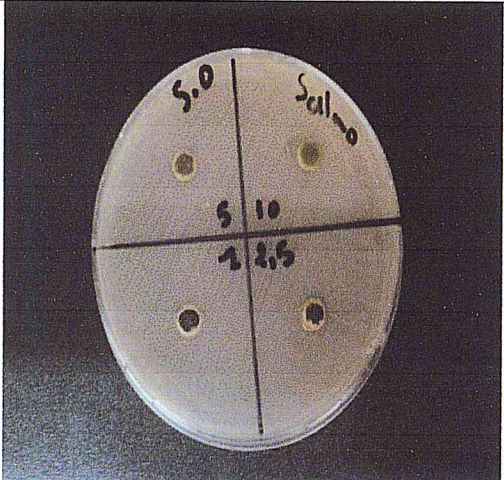
**Figure :** l'activité antimicrobienne de l'EEs de l'espèce *S. officinalis* et *R. officinalis*.



*Enterococcus faecalis*



*Salmonella abony*



*Micrococcus luteus*

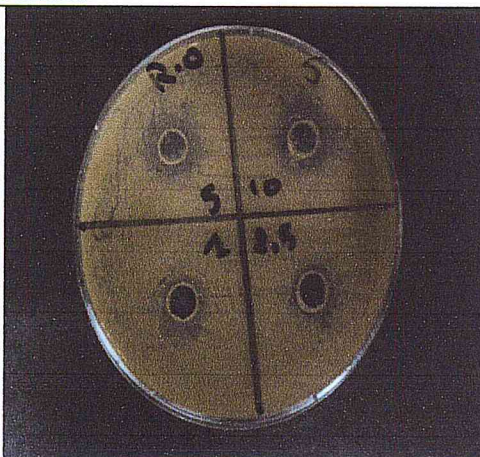
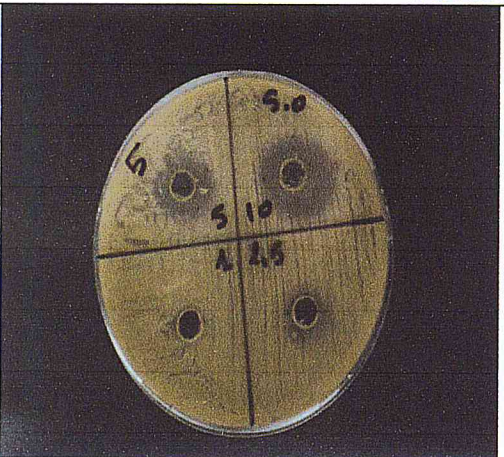




Figure : l'activité antimicrobienne de l'EEs de l'espèce *S. officinalis* et *R. officinalis*.

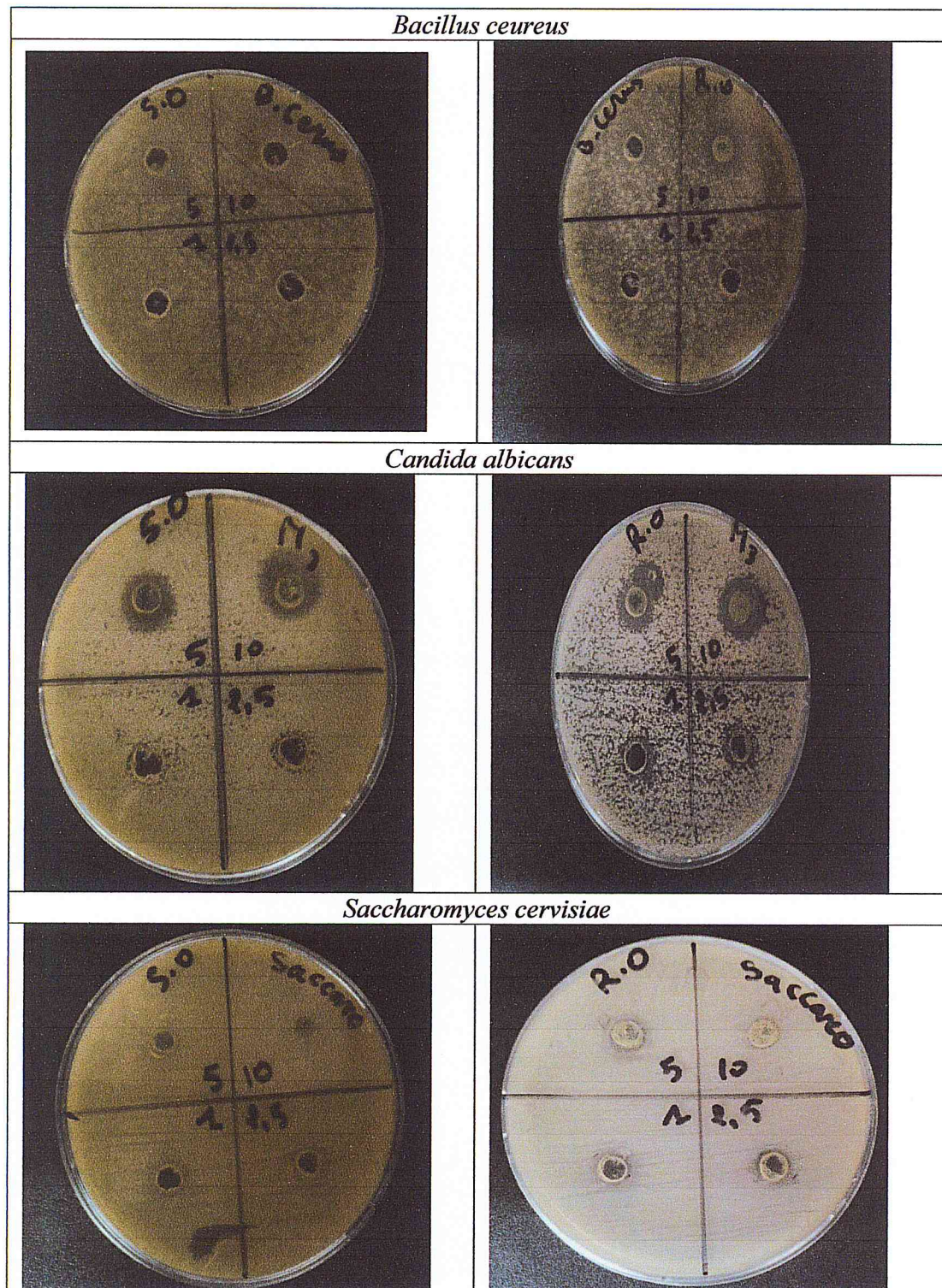
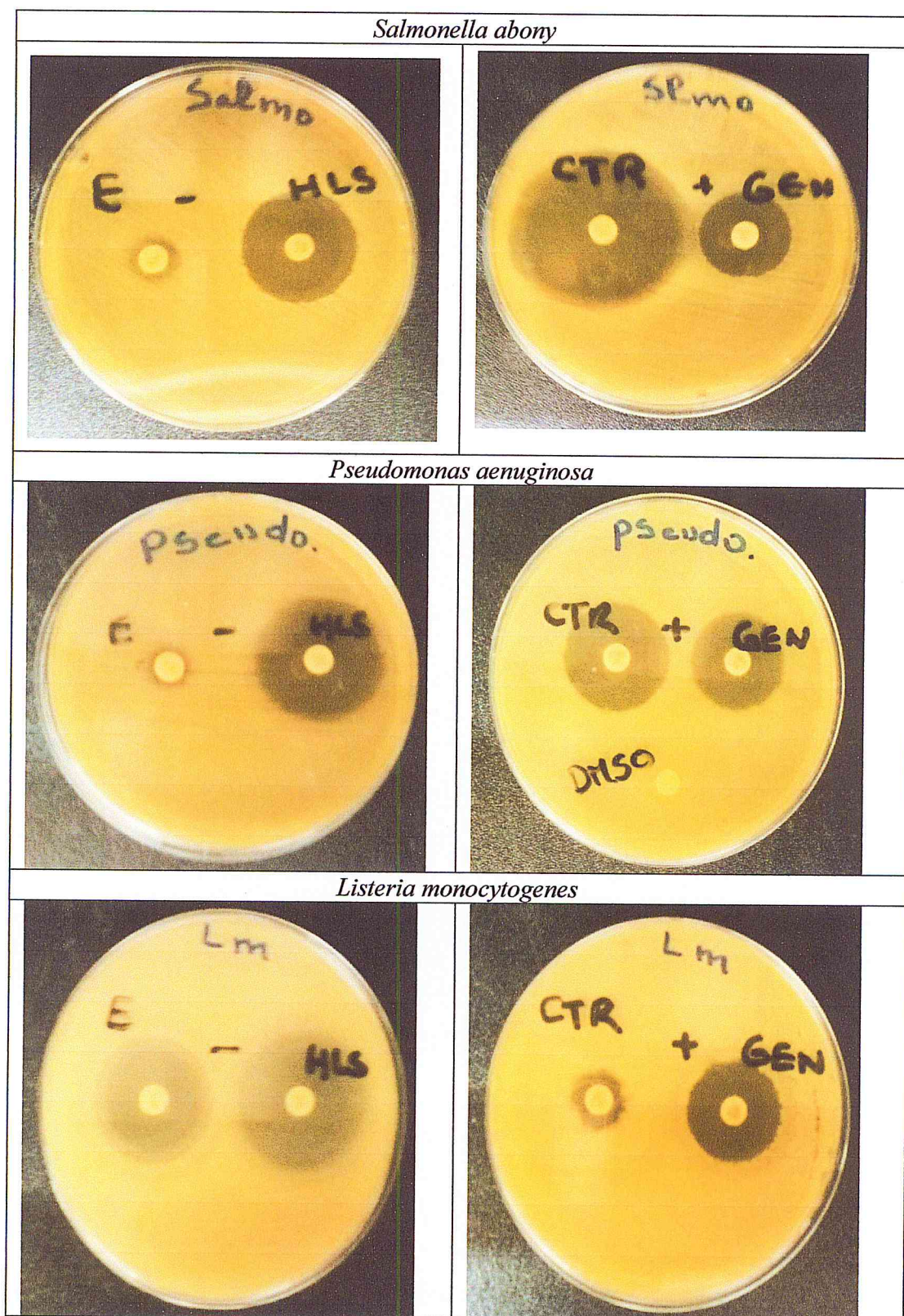


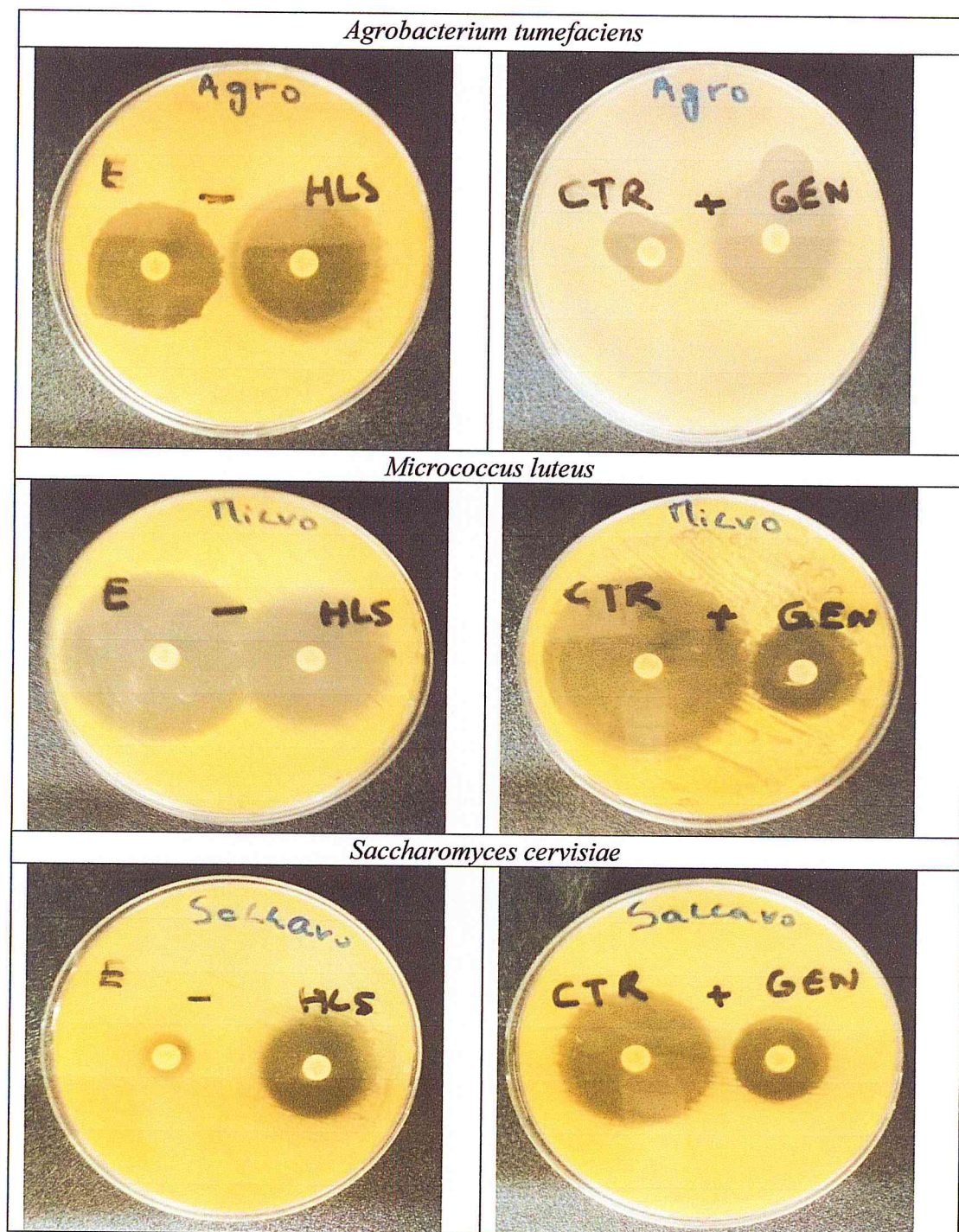
Figure : l'activité antimicrobienne de l'EEs de l'espèce *S. officinalis* et *R. officinalis*





**Figure :** Activité antimicrobienne des antibiotiques références.





**Figure :** Activité antimicrobienne des antibiotiques références.



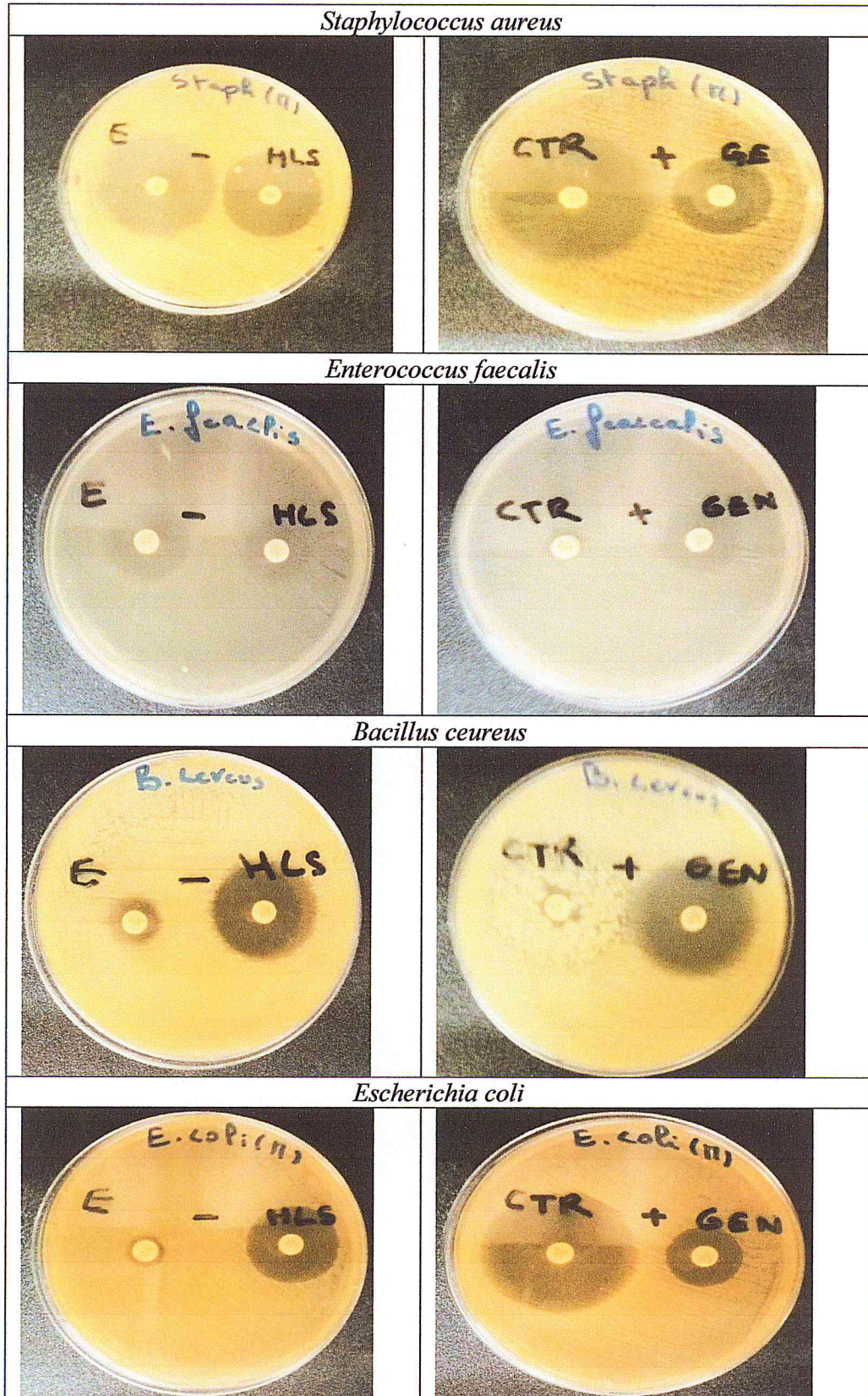
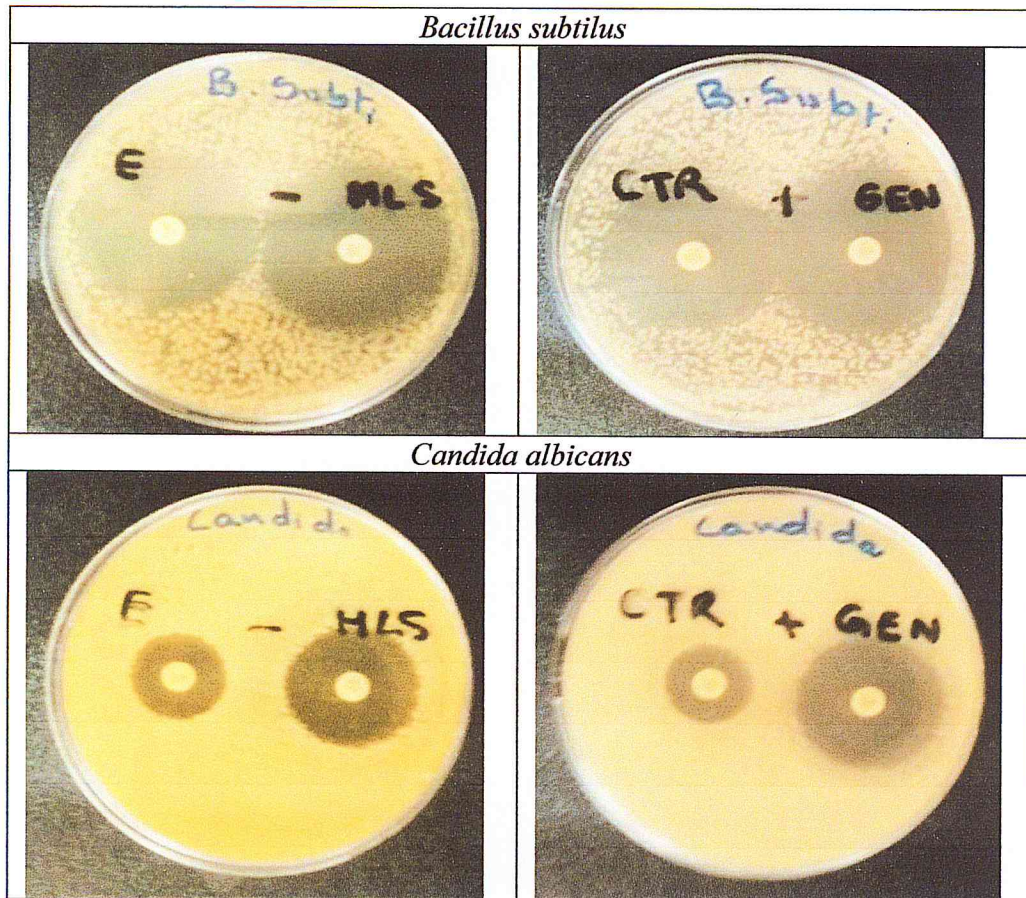


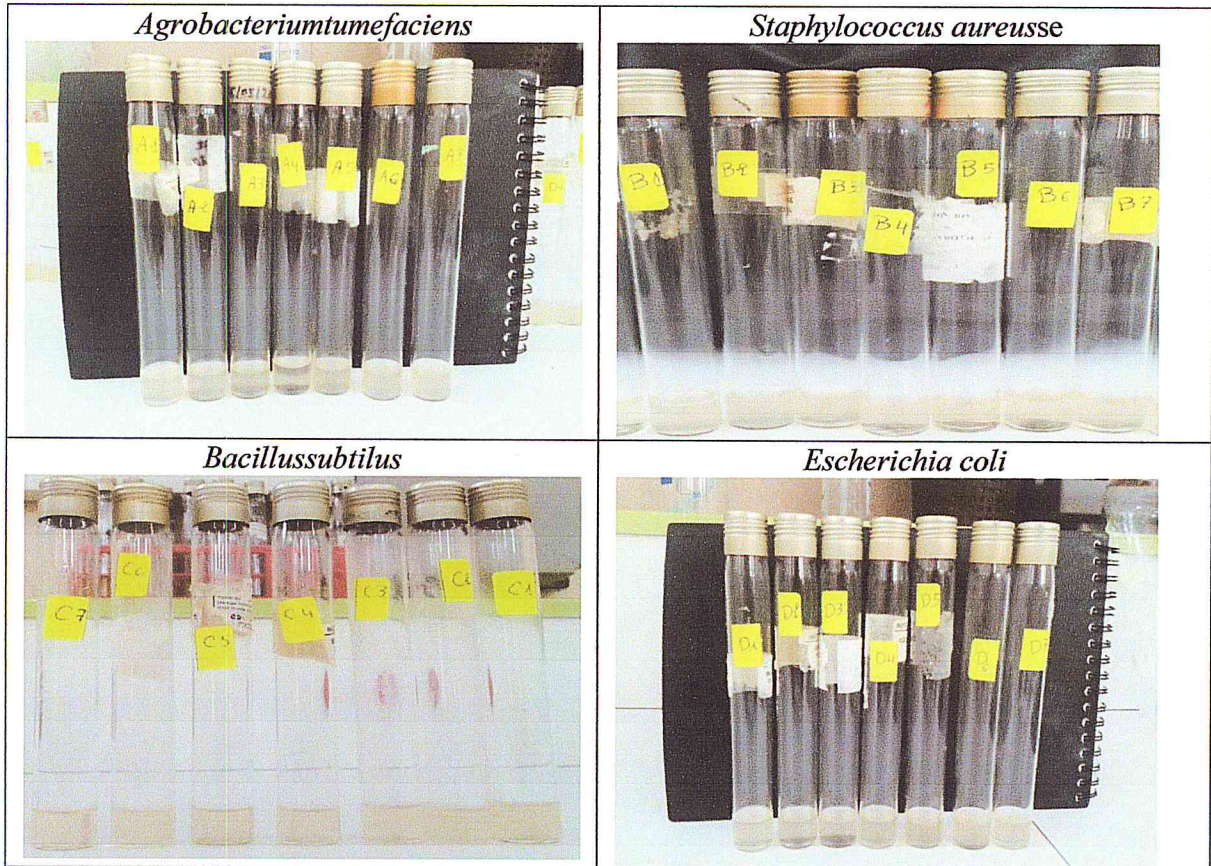
Figure : Activité antimicrobienne des antibiotiques références.



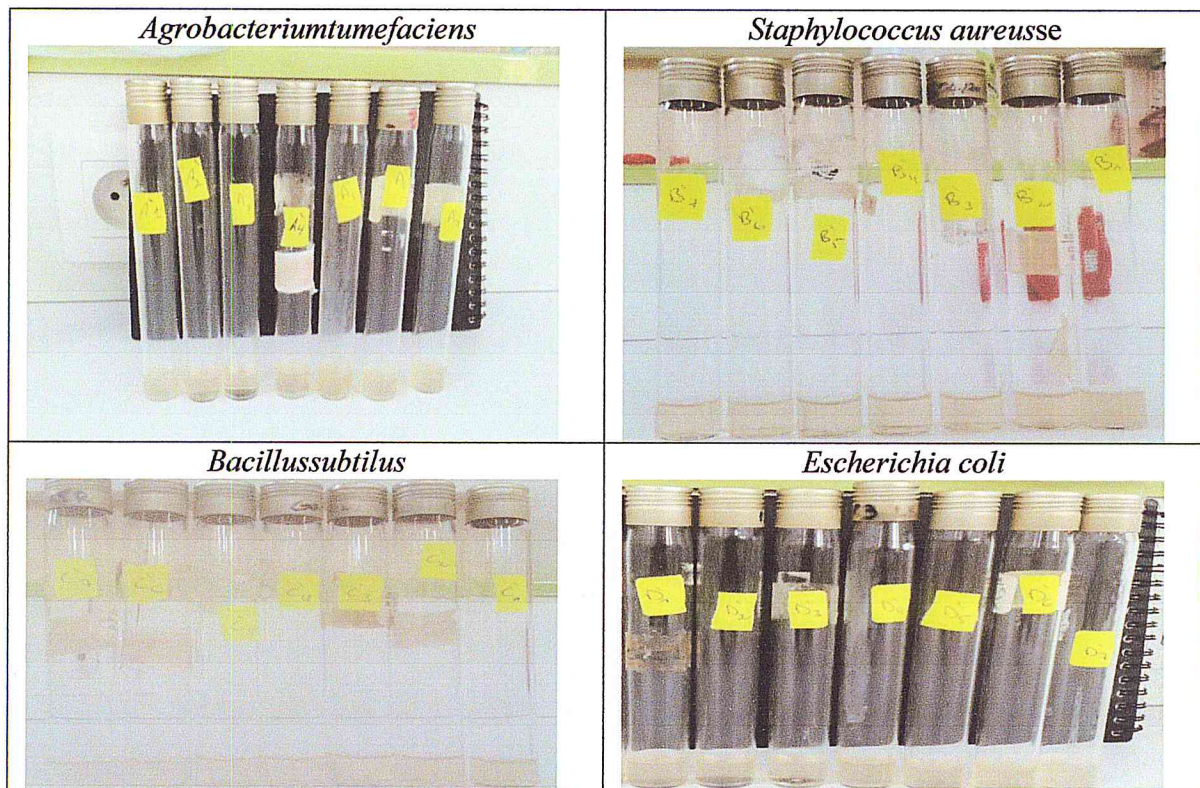


**Figure :** Activité antimicrobienne des antibiotiques références.



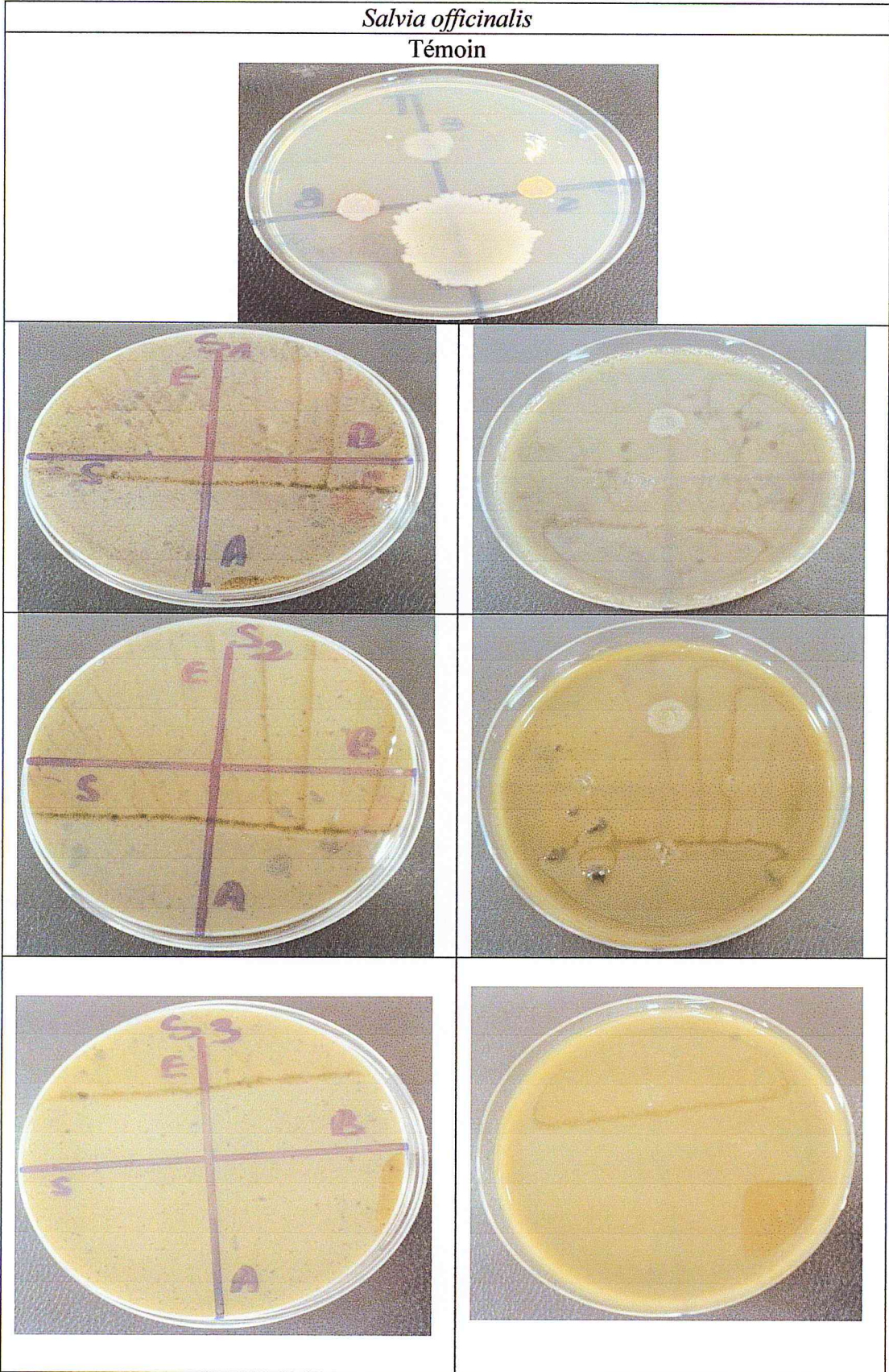


**Figure :** les résultats de la concentration minimale inhibitrice de l'HE de *S. officinalis*.



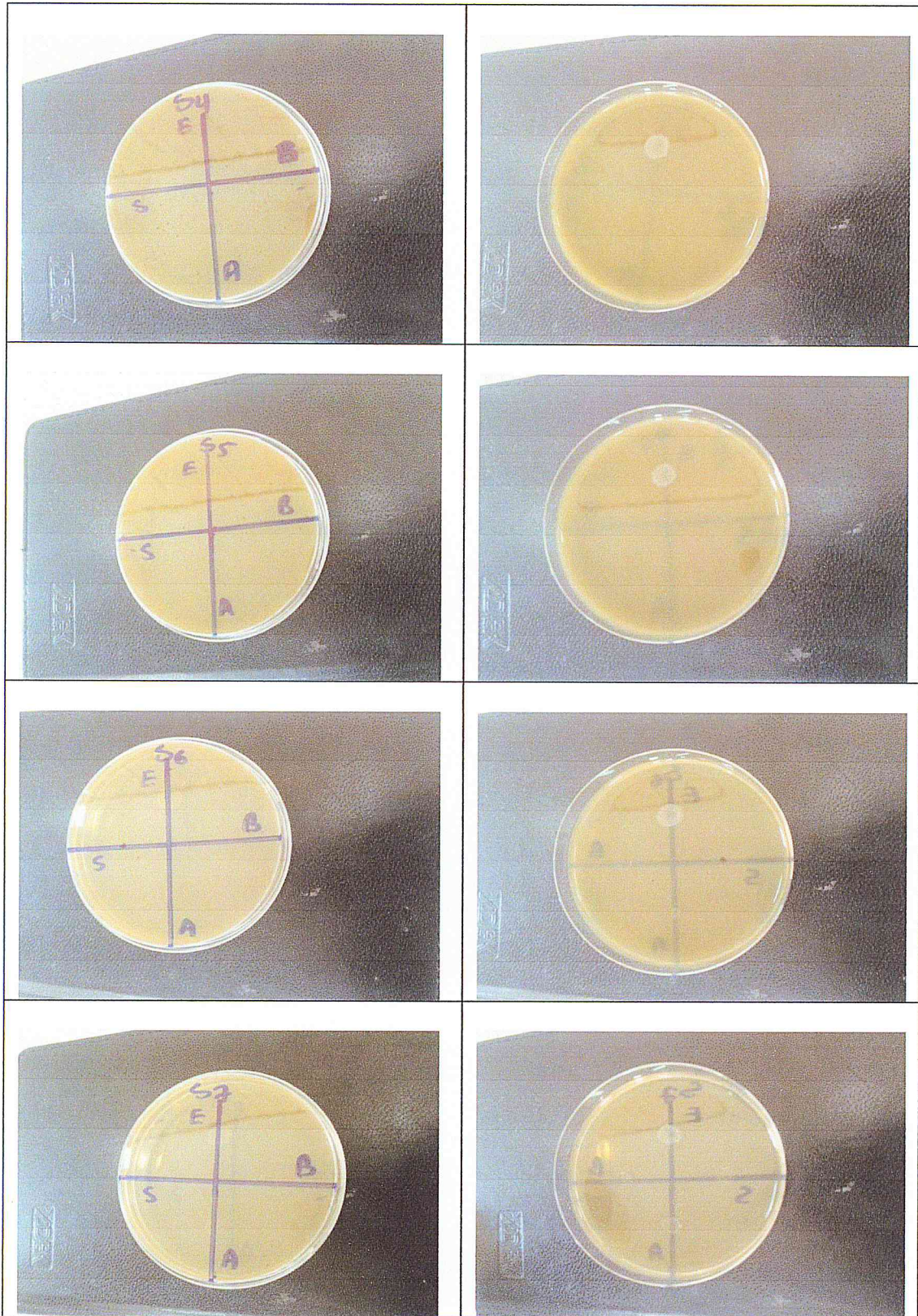
**Figure :** les résultats de la concentration minimale inhibitrice de l'HE de *R. officinalis*.





**Figure :** les résultats de la concentration minimale inhibitrice de l'EE de *S. officinalis*.





**Figure :** les résultats de la concentration minimale inhibitrice de l'EE de *S. officinalis*.



*R. officinalis*

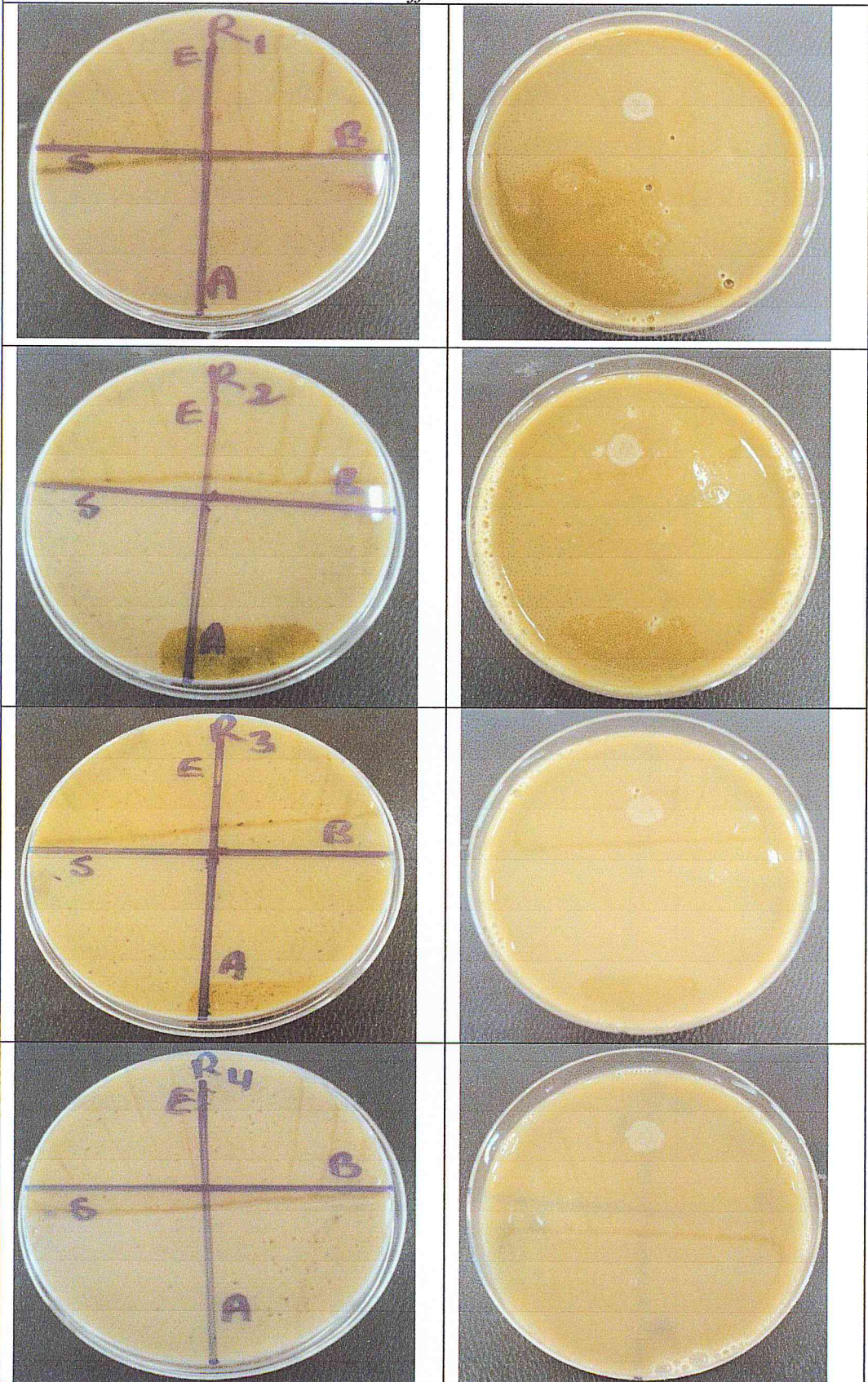
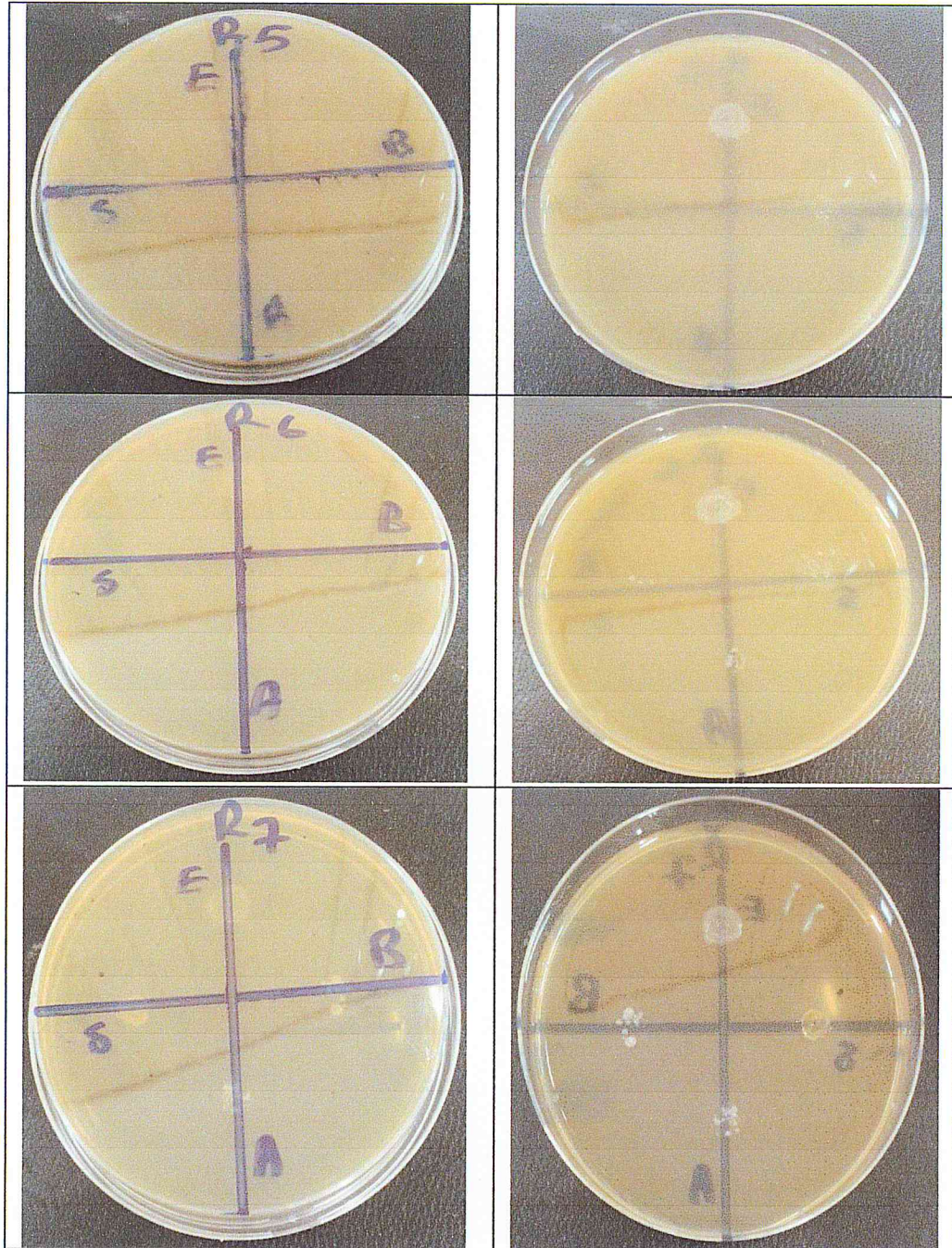


Figure : les résultats de la concentration minimale inhibitrice de l'EE de *R. officinalis*.





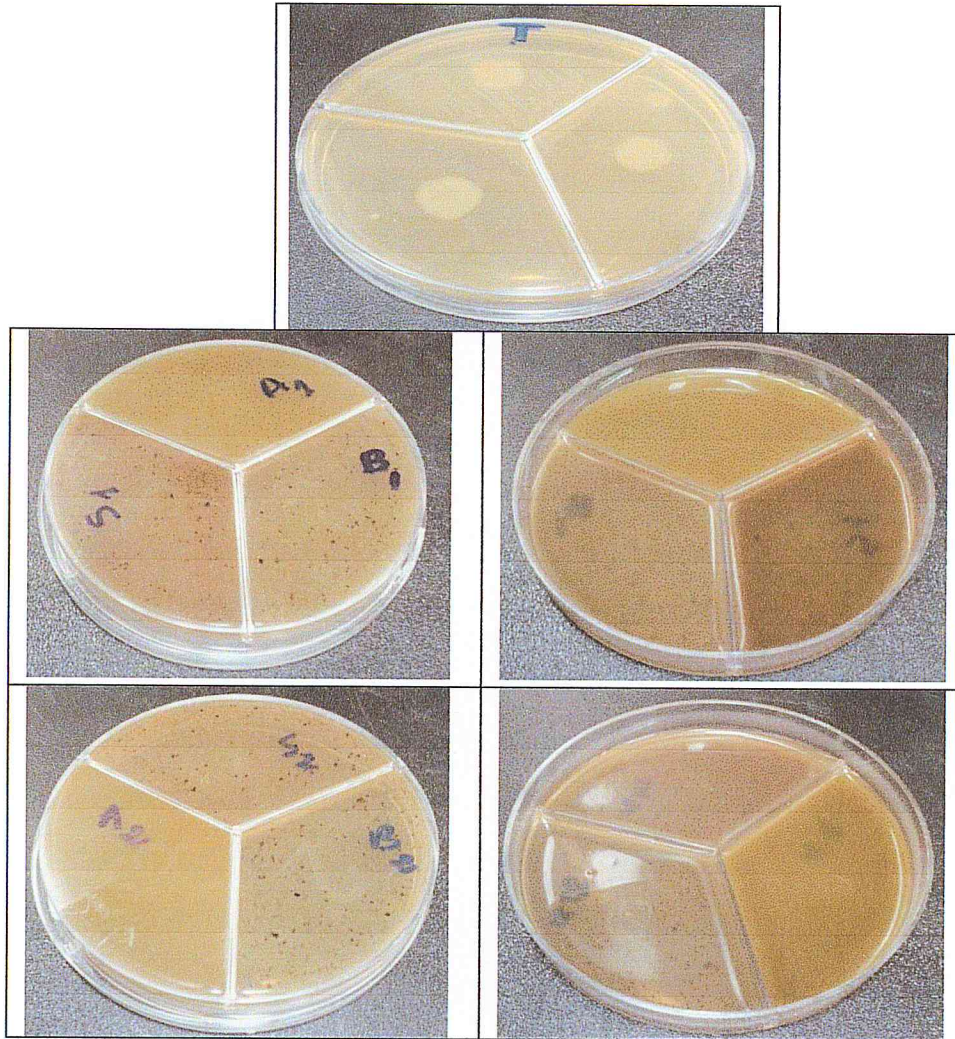
**Figure :** les résultats de la concentration minimale inhibitrice de l'EE de *R. officinalis*.





**Figure :** association de l'HE de l'espèce *S. officinalis* et *R. officinalis*.





**Figure :** association de l'EE de l'espèce *S. officinalis* et *R. officinalis*.



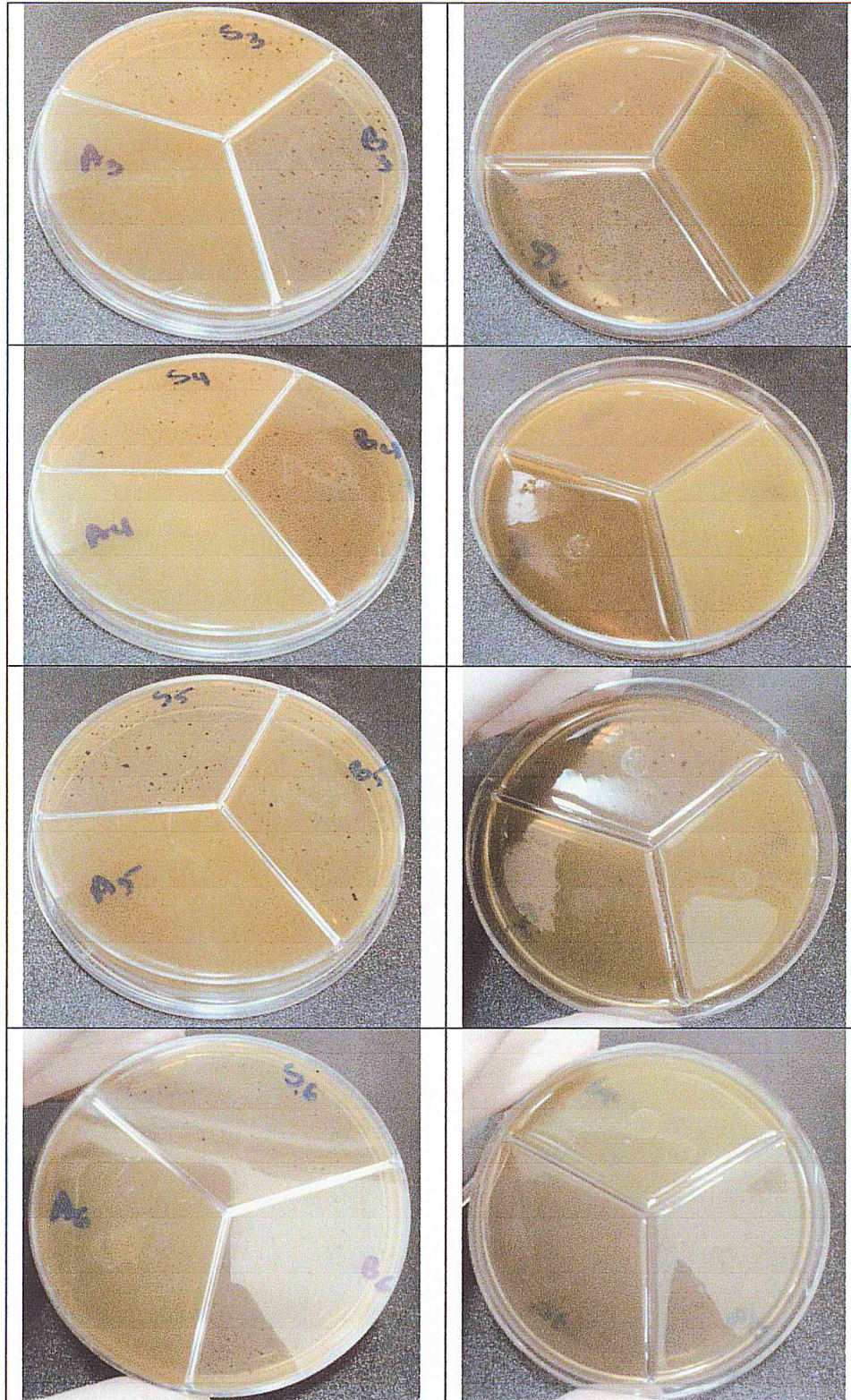
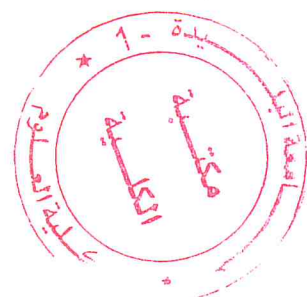
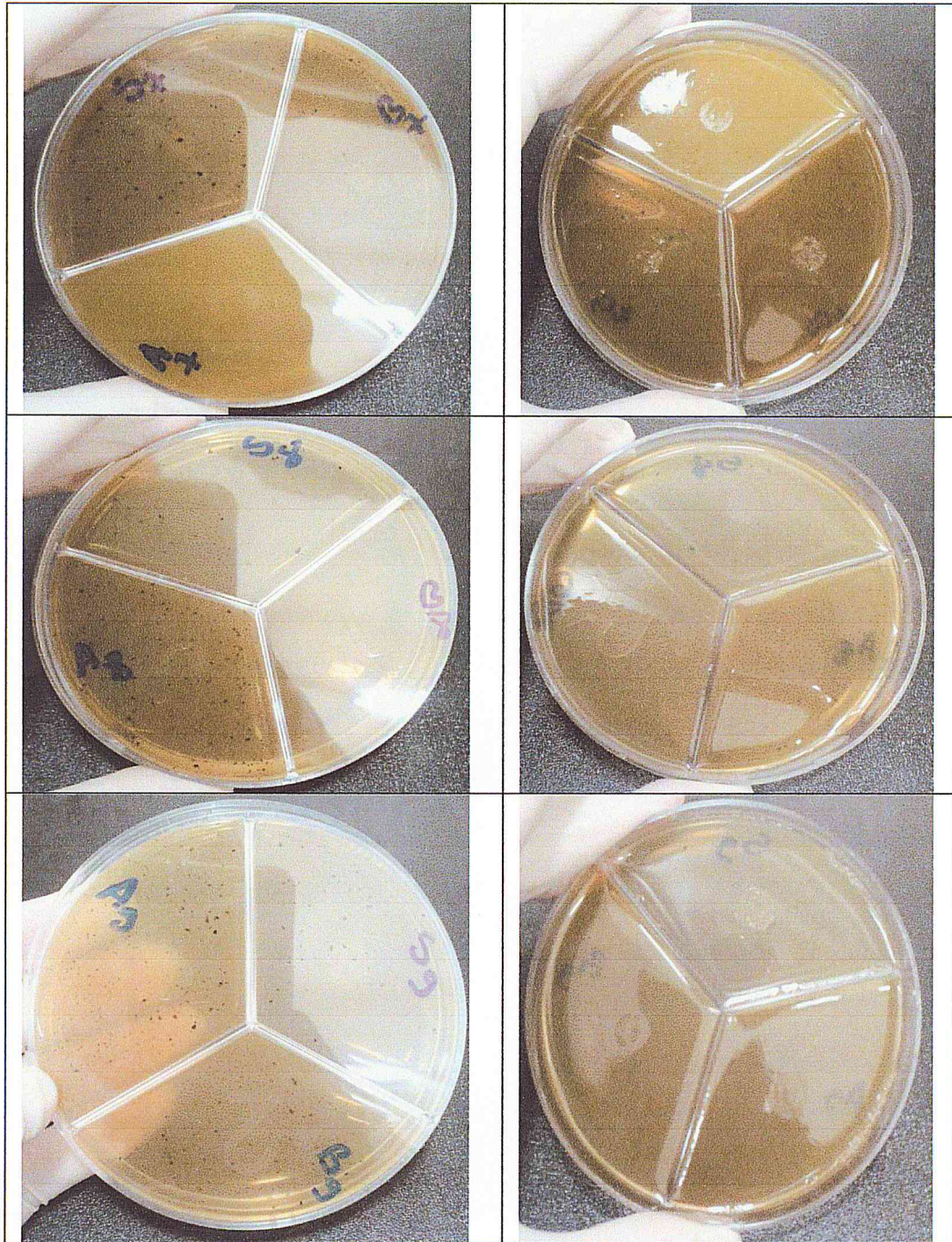


Figure : association de l'EE de l'espèce *S. officinalis* et *R. officinalis*.







**Figure :** association de l'EE de l'espèce *S. officinalis* et *R. officinalis*.



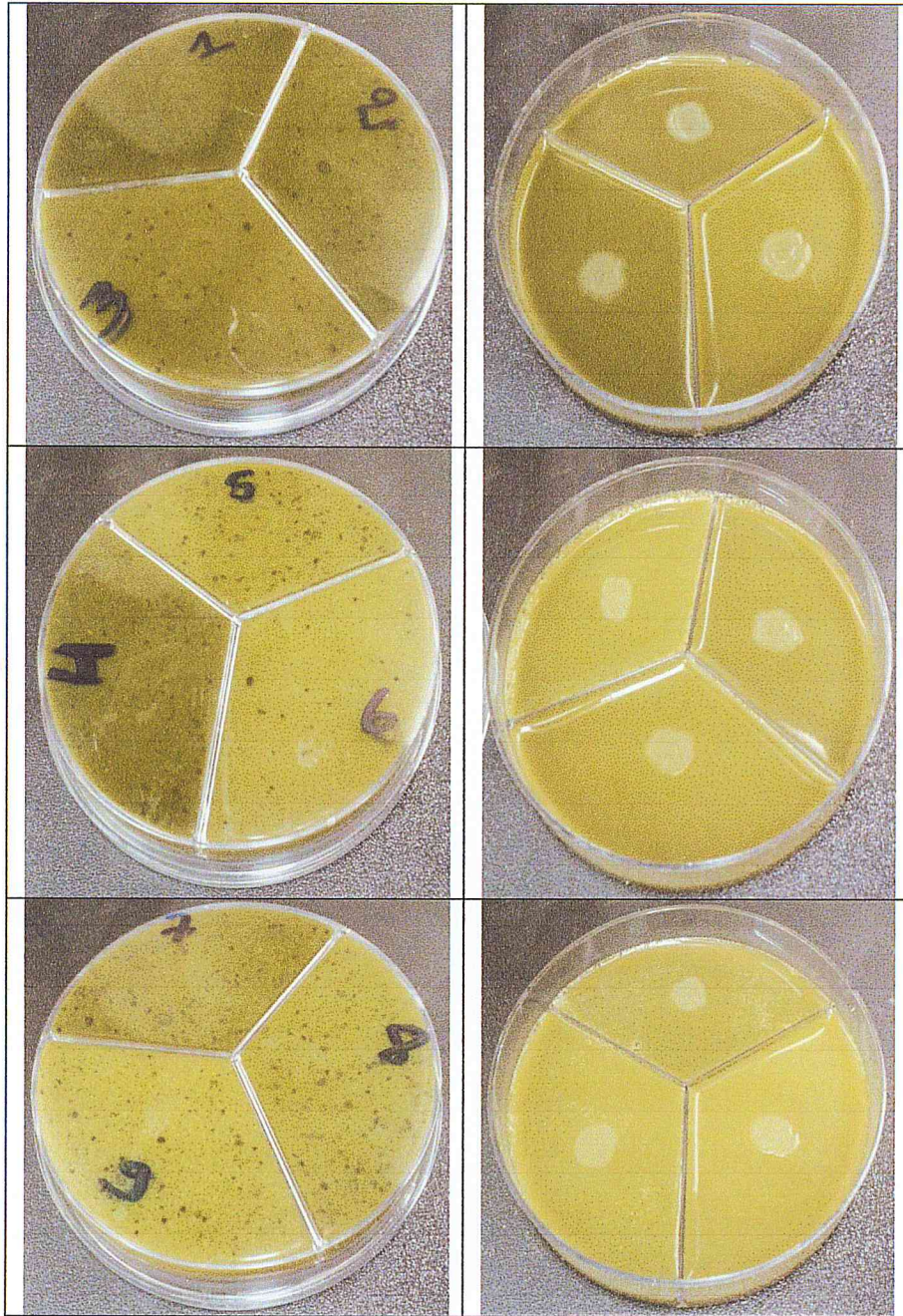


Figure : association des EE de l'espèce *S. officinalis* et *R. officinalis* sur *E.coli*.

