

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي



UNIVERSITE BADJI MOKHTAR
BADJI MOKHTAR UNIVERSITY

جامعة باجي مختار – عنابة-

Faculté des Sciences
Département de Biochimie

Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Magister en Biochimie

Option: Biochimie Appliquée

Thème

**Evaluation de l'activité antibactérienne de l'huile
essentielle de l'ail cultivé (*Allium sativum*) de l'est
Algérien vis-à-vis de différentes souches de
Pseudomonas aeruginosa.**

Présenté par

M^{elle} KHADRI Sihem

Directrice de mémoire: M^{me} ABBACI N. Professeur

Univ. Annaba

Devant le Jury

Président : Mr BOUZERNA N.

Professeur

Univ. Annaba

Examinatrice : M^{me} CHETTIBI H.

Maître de conférences

Univ. Annaba

Examineur : Mr AOUADI S.

Maître de conférences

Univ. Annaba

Année 2009

Remerciements

Je exprime ma profonde gratitude tout d'abord au bon Dieu miséricordieux de m'avoir donné le courage, la volonté et la force pour réaliser ce travail.

Je tiens à remercier profondément mon encadreur le Pr **BOUTEFNOUCHET N**, de m'avoir accepté de diriger ce travail, pour la confiance qu'elle m'accordé, merci pour avoir toujours été disponible pour être à mon écoute, pour m'avoir guidée tout en me laissant libre dans mes choix. Je tiens à vous exprimer également infiniment toute ma gratitude pour les nombreuses heures investies dans la correction du présent manuscrit

Je tiens également à remercier vivement monsieur le professeur **BOUZERNA N** d'avoir bien voulu accepter de présider le jury de ce travail, de leur aide, la mise à ma disposition du matériel de son laboratoire et leur encouragement

Je suis très honorer de la présence dans ce jury de monsieur le docteur **AOUADI S** et madame le docteur **CHITTIBI H**. Je leurs adresse également mes remerciement de bien vouloir examiner et juger ce mémoire.

Ma gratitude va également à monsieur le professeur **DEKHIL** responsable du laboratoire de microbiologie médicale du C.H.U Dorban pour leur collaboration.

Mes vifs remerciement vont également à monsieur **HADEF** docteur à l'institut de médecine à l'université Badji Mokhtar Annaba pour leur aide et la mise à ma disposition du matériel de son laboratoire.

Je voudrais remercier l'ensemble du personnel du laboratoire; Saaida, Sakina, Amel et Aicha (chimie) et mes collègues surtout Lilia, Sana, Sabrina, Mariem, Amel, Maya, Mina, Sara, Lamia, Saaoudi et Zinou pour leur aide, leur encouragement et leur disponibilité.

Je ne terminerais pas sans remercier ma famille ainsi que tous ceux qui m'ont apporté l'aide de près ou de loin afin d'accomplir au mieux cette étude.

Dédicace

*Je dédie ce modeste mémoire à mes chères parent, j'espère q'ils seront fier de
moi*

À ma chère grand-mère

À mon frère : Mohamed Lamine

À mes sœurs : Radhia et Iness

À tout mes enseignants et mes collègues

À toute ma chère famille

Résumé

Dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales aromatiques de l'est algérien, nous nous sommes intéressés à ce travail qui consiste à mettre en évidence la composition chimique de l'huile essentielle de l'ail cultivé (*Allium sativum*) obtenue par hydrodistillation ainsi que son activité antibactérienne vis-à-vis de différentes souches de *Pseudomonas aeruginosa*.

La composition chimique de l'huile essentielle extraite des bulbes d'*Allium sativum* récoltés de la région d'El Harrouche de la wilaya de Skikda a été étudiée par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse; huit composés ont été identifiés dont les constituants majoritaires sont: allyl méthyl trisulfide (34.61%) et diallyl disulfide (31.65 %).

L'activité antibactérienne a été testée sur 52 souches cliniques et une souche de référence de *P. aeruginosa* par la méthode de diffusion en disque, la méthode de dilution en milieu liquide et la méthode de dilution en milieu solide.

La méthode de diffusion a révélé que l'huile essentielle possède une activité inhibitrice vis-à-vis de plus de 50% des souches testées avec des zones d'inhibition faibles.

La méthode de dilution en milieu liquide et celle de la dilution en milieu solide ont donné des CMI respectivement entre 32 et 64 μ g/ml et entre 64 et 128 μ g/ml.

La détermination de la CMB a montré que l'huile essentielle étudiée est dotée d'une action bactériostatique vis-à-vis des souches testées de *P.aeruginosa*.

Mots clés: Plantes médicinales, huile essentielle, *Allium sativum*, activité antibactérienne, *Pseudomonas aeruginosa*.

Abstract

As part of the development of medicinal aromatic plants in eastern Algeria, we are interested in this work is to highlight the chemical composition of the essential oil of cultivated garlic (*Allium sativum*) obtained by hydrodistillation and its antibacterial activity against different strains of *Pseudomonas aeruginosa*.

The chemical composition of essential oil extracted from *Allium sativum* bulbs harvested in the region of El Harrouche of the wilaya of Skikda was studied by gas chromatography coupled with mass spectrometry; eight compounds have oil been identified whose major constituents are: allyl methyl trisulfide (34.61%) and diallyl disulfide (31.65%).

The antibacterial activity was tested against 52 clinical strains and a reference strain of *P. aeruginosa* by the method of disk diffusion, the method of dilution in liquid medium and the dilution method in solid.

The diffusion method showed that the oil has an inhibitory activity against over 50% of strains tested with small zones of inhibition.

The dilution method in liquid medium and the dilution in solid gave CMI respectively between 32 and 64 μ g/ml and between 64 and 128 μ g/ml.

The determination of the CMB has shown that the essential oil studied with a bacteriostatic action against the tested strains of *P.aeruginosa*.

Key words: Medicinal plants, essential oil, *Allium sativum*, antibacterial activity, *Pseudomonas aeruginosa*.

ملخص

في إطار تقييم النباتات الطبية العطرية في الشرق الجزائري قمنا من خلال هذا العمل بدراسة المكونات الكيميائية للزيت الطيار لنبته الثوم من صنف *Allium sativum* و كذلك دراسة تأثيره على نمو عدة سلالات بكتيرية مختلفة من صنف *P.aeruginosa*.

دراسة المكونات الكيميائية للزيت الطيار الذي استخلص من رؤوس نبتة الثوم المتحصل عليها من منطقة الحروش لولاية سكيكدة التي تمت عن طريق عملية كروماتوغرافيا الغاز - مطيافية الكتلة سمحت لنا بتحديد 8 عناصر حيث يعتبر: allyl méthyl trisulfide (34.61%) و diallyl disulfide (31.65%) هما المكونان الاساسيان.

تأثير الزيت على النمو البكتيري تم اختباره على 52 سلالة سريرية و سلالة مرجعية من صنف *P.aeruginosa* بواسطة طريقة الانتشار, طريقة التخفيف في وسط سائل و طريقة التخفيف في وسط صلب.

بينت طريقة الانتشار على أن الزيت الطيار لنبته الثوم له تأثير مثبت للنمو ضد أكثر من 50% من السلالات البكتيرية المختبرة حيث أدى إلى ظهور مناطق تثبيط ذات أقطار ضعيفة.

اصغر تركيز للزيت الطيار المثبته للنمو التي تمت دراسته بواسطة طريقة التخفيف في وسط سائل و كذلك طريقة التخفيف في وسط صلب هو على التوالي: بين 32 و 64 مكر و غرام /ميلي لتر و بين 64 و 128 مكر و غرام /ميلي لتر.

البحث عن اصغر تركيز قاتل للسلالات البكتيرية المختبرة بين أن الزيت الطيار المدروس يعمل عمل مثبت للنمو و ليس قاتل.

الكلمات الدالة: النباتات الطبية, الزيوت الطيارة, الثوم, التثبيط البكتيري, *P.aeruginosa*.

Sommaire

Résumés

Introduction..... 1

Bibliographie

1- Huiles essentielles

1-1- Caractéristiques générales.....	3
1-2- Biosynthèse.....	5
1-3- Localisation et lieu de synthèse.....	9
1-4- Rôle physiologique.....	10
1-5- Facteurs de variabilité.....	10
1-6 - Méthodes d'extraction.....	10
1-6-1- Extraction par entraînement à la vapeur d'eau.....	10
1-6-1-1- Hydrodistillation simple.....	11
1-6-1-2- Entraînement à la vapeur sèche.....	11
1-6-1-3- Hydrodiffusion.....	11
1-6-2- Extraction par expression.....	12
1-7- Activités biologiques et mode d'action.....	13
1-7-1- Activité antimicrobienne.....	13
1-7-2- Activité antioxydante.....	13
1-7-3- Activités diverses.....	13

2- *Allium sativum*

2-1- Position systématique.....	15
2-2- Description de la plante.....	16
2-3- Origine.....	17
2-4- Culture.....	17
2-5- Composition chimique.....	18
2-6- Principes actifs et rôles pharmacologiques.....	20
2-7- Certains conseils pour l'utilisation d' <i>Allium sativum</i>	21

3- *Pseudomonas aeruginosa*

3-1- Définition.....	22
3-2- Classification.....	22

3-3- Habitat	22
3-4- Caractères bactériologiques	23
3- 4-1- Caractères morphologiques	23
3-4-2- Caractères cultureux	23
3-4-2-1- Aspect des colonies sur un milieu de culture.....	23
- Sur un milieu de culture solide	23
- Sur un milieu de culture liquide.....	24
3-4-3- Production des pigments	24
3-4-3-1- Pigments fluorescents	24
3-4-3-1-1-Pyoverdine.....	24
3-4-3-2- Pigments phénaziniques non fluorescents.	24
3-4-3-2-1- Pyocyanine.	24
3-4-3-2-2- Autres pigments phénaziniques	25
3-5- Caractères biochimiques.....	25
3-6- Facteurs de virulence	25
3-7- Infections dues au <i>P.aeruginosa</i>	28
3-7-1- Infections pulmonaires.....	28
3-7-2 - Infections urinaires.....	28
3-7-3- Infections oculaires.....	28
3-7-4- Infections ORL (Ortho-rhino-laryngologie).....	28
3-8- Résistance aux antibiotiques.....	29

Matériels et Méthodes

1- Matériels	
1-1- Matériel biologique.....	30
1-1-1- Bulbes d' <i>Allium sativum</i>	30
1-1-2- Souches bactériennes	30
1-2- Matériel du laboratoire	30
2- Méthodes	
2-1-Analyse chimique.....	32
2-1-1- Extraction.....	32
2-1-1-1- Préparation du matériel végétal.....	32
2-1-1-2- Hydrodistillation.....	33
2-1-1-3- Séparation des deux phases.....	34
2-1-2- Calcul du rendement	35

2-1-3- Mesure de la densité	35
2-1-4- Analyse de la composition chimique.....	35
2-1-4-1- Principe de la technique.....	35
2-1-4-2- Conditions opératoires.....	36
2-2- Analyse microbiologiques	37
2-2-1- Provenance des souches	37
2-2-2 - Vérification de la pureté des souches	37
2-2-2-1- Etude microscopique	37
2-2-2-1-1- Examen à l'état frais	37
2-2-2-1-2- Examen après coloration de Gram.....	37
2-2-2-2- Etude des caractères cultureux.....	38
2-2-3 - Identification biochimiques des souches.....	38
2-2-3-1- Recherche de l'enzyme respiratoire (Oxydase).....	38
2-2-3-2- Mise en évidence de la production des pigments spécifiques.....	39
2-2-3-3- Etude des caractères biochimiques par la galerie API 20NE.....	40
2-2-4- Conservation des souches bactériennes.....	44
2-2-5- Test de sensibilité aux antibiotiques: antibiogramme	
Par la méthode de diffusion en disque	44
2-2-6- Etude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle.....	47
2-2-6-1- Méthode de diffusion en disque : l'aromatogramme.....	47
2-2-6-2- Détermination de la concentration minimale inhibitrice	
(CMI) par la méthode de dilution	48
2-2-6-2-1- Méthode de dilution en milieu liquide	48
2-2-6-2-2- Méthode de dilution en milieu solide.....	50
2-2-6-3- Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB).....	52
2-3- Etude statistique.....	53
Résultats.....	54
Discussion.....	70
Conclusion et perspectives.....	76
Références bibliographiques	
Annexes	

Liste des abréviations

ADH :	Arginine déshydrolyse
ATB:	Antibiotique
ATP:	Adénosine triphosphate
CHU:	Centre hospitalo-universitaire
CMB:	Concentration minimale bactéricide
CMI:	Concentration minimale inhibitrice
CoA:	Coenzyme A
CPG/SM:	Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse
CPG:	Chromatographie en phase gazeuse
DO:	Densité optique
FPP:	Farnesyl diphosphate
GLU:	GLUcose
GPP:	Geranyl diphosphate
IPP:	Diphosphate d'isopentényle
NCCLS:	National committee for clinical laboratory standards
SM :	Spectrométrie de masse
Subsp:	Sous espèce
UFC:	Nombre de colonie formant des unités
URE:	Urée
UV:	Ultra violet
V/V:	volume par volume

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
01	Facteurs de virulence de <i>P.aeruginosa</i> , leurs mécanismes d'action et leurs contributions à la virulence.	27
02	Situation géographique de la région de la récolte.	30
03	Origine des prélèvements des souches testées.	37
04	Tableau de lecture de l'API 20NE.	43
05	Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour <i>P.aeruginosa</i> .	46
06	Composition chimique de l'huile essentielle d' <i>Allium sativum</i> .	55
07	Résultats de la sensibilité aux antibiotiques des souches testées de <i>P.aeruginosa</i> .	61
08	Diamètres des zones d'inhibition en (mm) de l'huile essentielle d' <i>Allium sativum</i> .	63
09	Valeurs des CMI de l'huile essentielle obtenues par les deux variantes de la méthode de dilution (en µg/ml).	66

Liste des figures

N°	Titre	Page
01	Structures chimiques de certains composants courants des huiles essentielles.	04
02	Principales étapes de la biosynthèse du diphosphate d'isopentényle (IPP).	07
03	Biosynthèse de différentes classes terpéniques chez les plantes.	08
04	Glande simple entièrement chargée d'huile essentielle.	09
05	Poiles épidermique sécréteurs d'huile essentielle sur le calice d'une fleur d'un origan.	09
06	Montage à hydrodistillation simple.	11
07	Plante d' <i>Allium sativum</i> .	17
08	Bulbes d' <i>Allium sativum</i> .	17
09	Différents changements chimiques au niveau de la gousse d' <i>Allium sativum</i> .	19
10	Carte géographique de la wilaya de Skikda montrant la région de la récolte.	31
11	Préparation du matériel végétal.	32
12	Transformation de l'alliine en allicine.	33
13	Montage d'hydrodistillation employé pour l'extraction de l'huile essentielle.	34
14	Mode opératoire de la galerie API 20 NE.	42
15	Technique de l'antibiogramme par la méthode de diffusion en disque.	45
16	Détermination de la CMI par la méthode de dilution en milieu liquide.	49

17	Détermination de la CMI par la méthode de dilution en milieu solide.	51
18	Détermination de la CMB.	52
19	Distribution en pourcentage des différents composants de l'huile essentielle d' <i>Allium sativum</i> .	56
20	Aspect microscopique de <i>P.aeruginosa</i> après coloration de Gram	57
21	Aspect macroscopique des colonies de <i>P.aeruginosa</i> sur gélose nutritive.	59
22	Aspect macroscopique des colonies de <i>P.aeruginosa</i> sur gélose au cétrimide.	59
23	Fiche des résultats du système API 20NE de <i>P.aeruginosa</i> .	60
24	Pourcentage de résistance aux antibiotiques des souches testées.	62
25	Pouvoir inhibiteur de l'huile essentielle d' <i>Allium sativum</i> vis-à-vis des 53 souches de <i>P.aeruginosa</i> .	64
26	Zone d'inhibition de la souche testée N°4 montrant l'activité de l'huile essentielle d' <i>Allium sativum</i> .	65
27	CMI obtenus par les deux variantes de la méthode de dilution.	67
28	CMI des souches testées N°: 9, 10, 18 et 19 obtenues par la méthode de dilution en milieu solide.	69

Introduction

Depuis longtemps, Les plantes médicinales ont été employées en phytothérapie comme remèdes aux maladies humaines vue leur richesse en certaines, voire en milliers de composants de valeur thérapeutique, à travers les siècles les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation de ces plantes dont leur savoir a été transmis de génération en génération. [77, 120].

Dans les cas extrêmes, l'action de la médecine moderne soulage les patients de manière indéniable et sauve de nombreuses vies, toutefois malgré les énormes progrès réalisés par cette médecine la phytothérapie offre de multiples avantages notamment dans le cas où l'efficacité des antibiotiques qui sont considérés comme la solution quasi universelle aux infections décroît vue que les bactéries se sont peu à peu adaptées à ces agents antibactériens et leur résistent de plus en plus ainsi que les effets secondaires induits par les produits pharmaceutiques inquiètent les utilisateurs qui se tournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme [50, 77].

Certaines plantes peuvent constituer une source majeure de médicaments grâce leur richesse en métabolites secondaires, ces derniers font et restent l'objet de nombreuses recherches in vitro comme in vivo notamment la recherche de nouveaux constituants naturels tels que les composés phénoliques, les saponosides, les alcaloïdes et les huiles essentielles [62].

Les huiles essentielles comptent parmi les plus importants principes actifs des plantes aromatiques, elles possèdent des propriétés plus ou moins connues dont leur vertu anti-infectieuse est de loin celle qui est la mieux établie, cependant l'évaluation des propriétés phytothérapeutiques des huiles essentielles notamment leur activité antibactérienne demeure une tâche très intéressante et utile en particulier pour les plantes médicinales les plus connues et les plus utilisées en médecine traditionnelle, l'activité thérapeutique des huiles essentielles dépend principalement de leur composition chimique [28, 25, 45, 117].

C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés à étudier dans ce travail la composition chimique de l'huile essentielle de l'ail cultivé (*Allium sativum*) de l'est algérien; *Allium sativum* est une plante alimentaire très connue et très étudiée en phytothérapie, ainsi

que son pouvoir antibactérien vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*; une bactérie à Gram négatif qui montre souvent un échec thérapeutique à cause de sa multirésistance aux agents antibactériens.

Pour atteindre cet objectif, notre travail sera donc initié par une extraction de l'huile essentielle par la méthode d'hydrodistillation puis sera suivi d'une analyse de la composition chimique de l'huile obtenue et en fin sera terminé par des tests de sensibilités de différentes souches de *P.aeruginosa* vis-à-vis de l'huile essentielle en question.

1- Huiles essentielles

1-1- Caractéristiques générales

Les huiles essentielles sont des substances odorantes, liquides, volatiles à température ambiante, solubles dans les solvants organiques et peu solubles dans l'eau, ce type de huiles s'oppose aux huiles fixes qui sont des lipides par leur volatilité et leur composition chimique. Les huiles essentielles produites naturellement par des plantes dites aromatiques sont très utilisées dans l'industrie des cosmétiques, de parfumerie où elles sont considérées comme étant des éléments de base et dans le domaine de l'aromathérapie, elles sont aussi utilisées pour apporter de la saveur, des arômes au café et aux liqueurs distillées, elles ont des applications importantes en médecine soit par leur qualité odorante soit pour soulager la douleur ou pour leur efficacité physiologique [15, 35, 51,119].

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes et éminemment variables de constituants qui appartiennent de façon quasi exclusive à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes: le groupe des terpènes d'une part et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane d'autre part. Les composés de la dégradation d'acide gras et les composés de la dégradation des terpènes sont aussi fréquemment retrouvés dans les huiles essentielles [28, 65, 96,110].

La figure 1 représente les structures chimiques de certains composants courants des huiles essentielles.

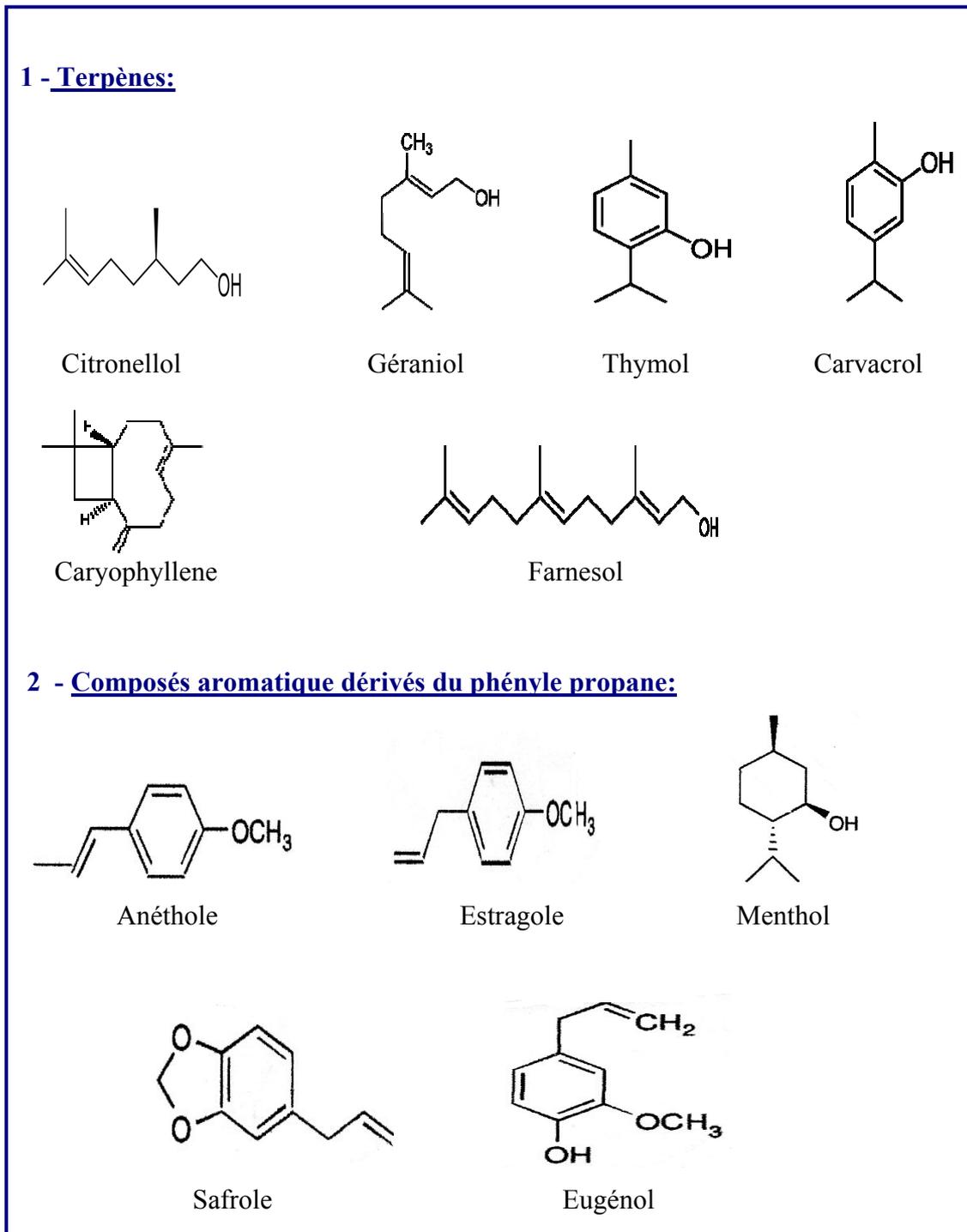


Figure1 : Structures chimiques de certains composants courants des huiles essentielles

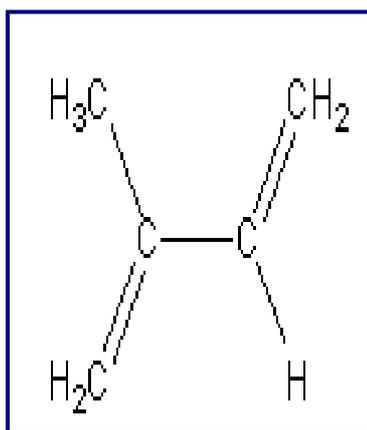
[13].

1-2- Biosynthèse

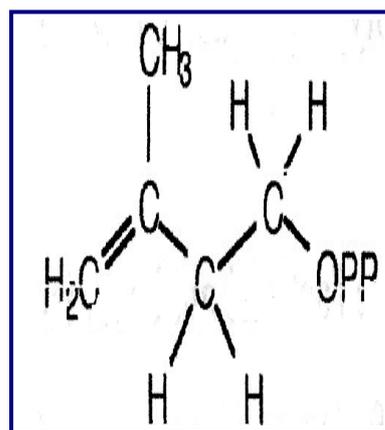
Étant donné que les terpènes sont les constituants caractéristiques et importants de la plupart des huiles essentielles, pour cette raison nous allons nous limiter à l'étude de la biosynthèse de ce groupe chimique [55].

Les terpènes constituent une famille de composés largement répandus dans le règne végétal, dans le cas des huiles essentielles seront rencontrés seuls les terpènes les plus volatils c'est-à-dire ceux dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée tels que les monoterpènes et les sesquiterpènes qui peuvent exister soit sous forme d'hydrocarbures de formule brute $(C_5H_8)_n$ soit sous forme de dérivés oxygénés de ces hydrocarbures appelés : les terpénoïdes incluent des alcools, des aldéhydes, des esters, des éthers, des cétones, des phénols et des oxydes [28].

La structure chimique des terpènes représente une particularité importante qui est la présence dans leur squelette de l'unité de base isoprène à 5 atomes de carbone (C_5H_8) reconnue par Wllah dès 1887 [122]. Cet isoprène est à la base du concept de la "règle isoprénique " énoncée en 1953 par Ruzicka [104] et complétée par Lynen et al [21,85], cette règle considère le diphosphate d'isopentényle (IPP), désigné sous le nom d'isoprène actif comme le véritable précurseur de la molécule terpénique d'où le nom d'isoprénoïde sous lequel il peut également désigner.



Isoprène



Diphosphate d'isopentényle (IPP)

La première étape de la synthèse de la molécule d'IPP consiste en la condensation de deux molécules d'acétyl CoA pour former de l'acétoacétyl CoA, cette réaction est d'abord catalysée par une acétoacétyl CoA thiolase couplée à une Fe(2)quinone, puis l'HMG CoA

synthétase catalyse la fixation d'une troisième molécule d'acétyl CoA qui donne le B-hydroxy-B-méthylglutaconyl coenzyme A (HMG CoA) puis, la réduction de la fonction acide (engagée dans une liaison thioester) en alcool est catalysée par l'HMG CoA réductase et donne l'acide mévalonique.

Un groupement diphosphate va ensuite être fixé sur la fonction alcool primaire de l'acide mévalonique, le mévalonate 5-diphosphate ainsi formé va réagir avec une troisième molécule d'ATP; cette réaction fournit un composé instable qui se décompose spontanément en perdant la fonction alcool tertiaire et le groupement carbonyle libre conduisant à la formation de l'IPP qui est la forme biologiquement active de la molécule isoprénique [75,101].

La figure 2 montre les principales étapes de la biosynthèse du diphosphate d'isopentényle (IPP)

La biosynthèse des terpènes implique l'addition de l'unité isoprène (IPP) avec son isomère pour former le geranyl diphosphate (GPP: C₁₀) qui est le précurseur de tous les monoterpènes, le GPP va se condenser avec une autre unité IPP pour former le diphosphate de farnesyl (FPP: C₁₅) qui est à l'origine des sesquiterpènes [42].

La figure 3 montre la biosynthèse de différentes classes terpéniques chez les plantes.

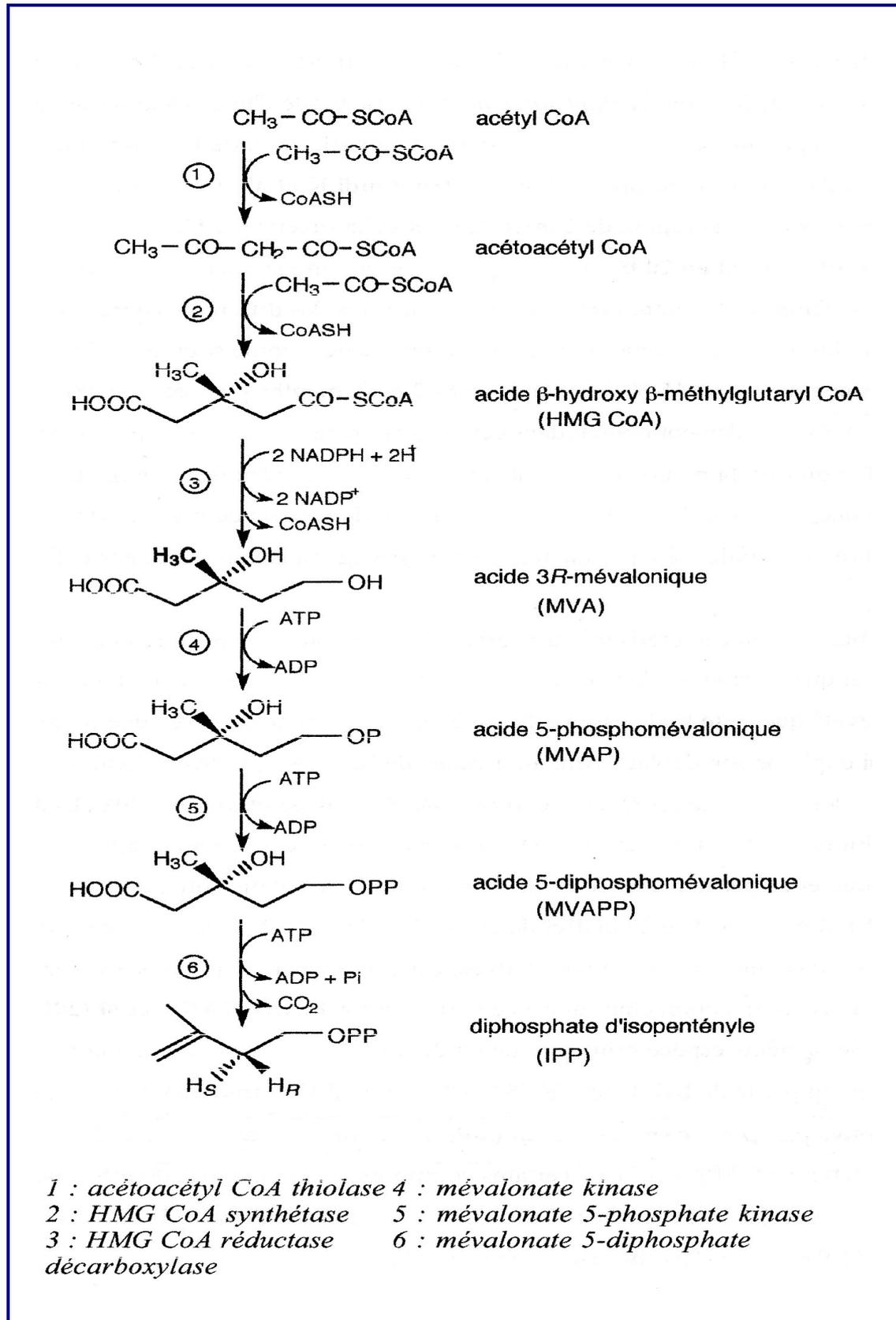


Figure 2 : Principales étapes de la biosynthèse du diphosphate d'isopentényle (IPP) [75].

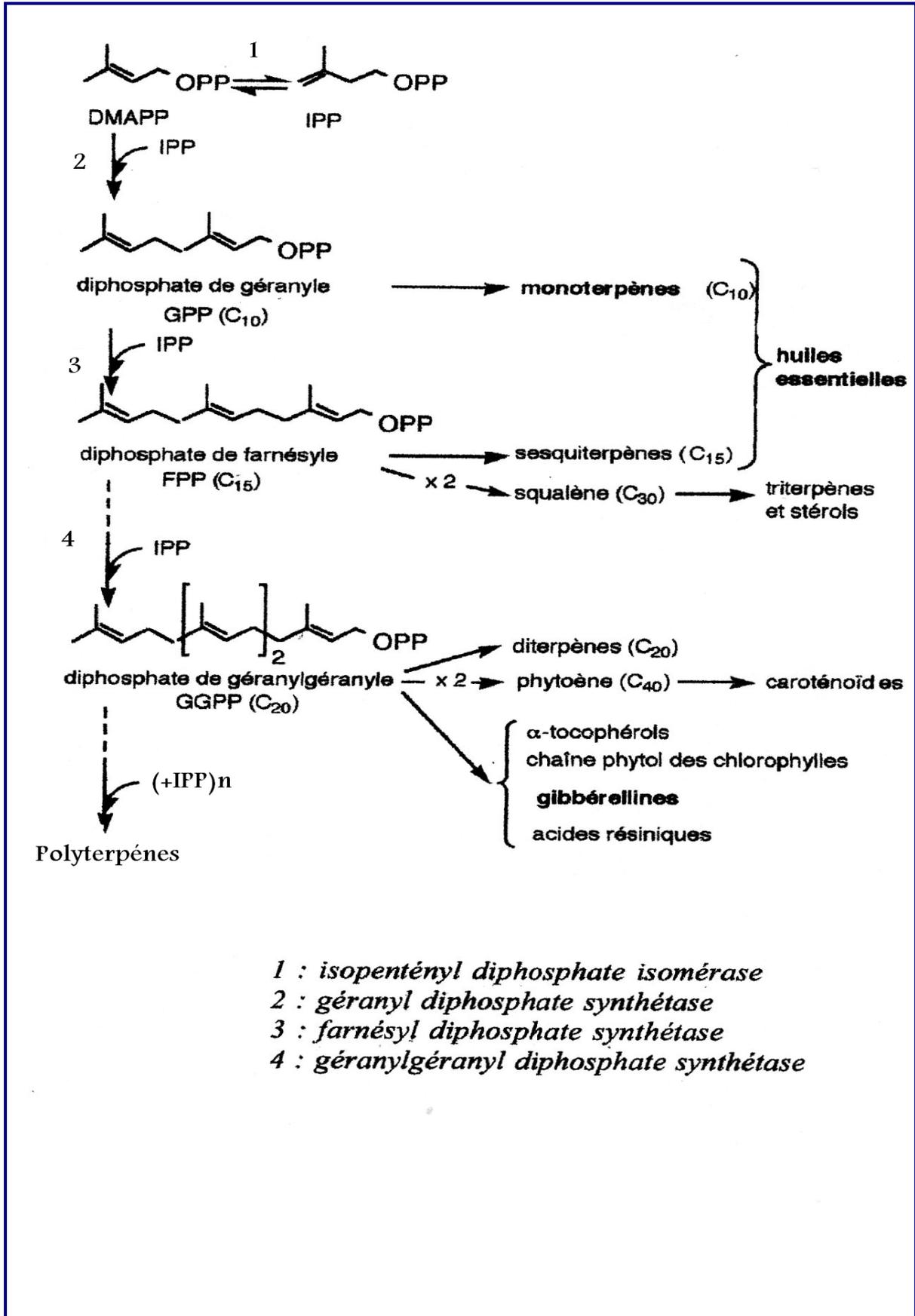


Figure 3 : Biosynthèse de différentes classes terpéniques chez les plantes [75].

1-3- Localisation et lieu de synthèse

Les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs dont tous les organes végétaux des plantes aromatiques peuvent les contenir :

- les fleurs : l'oranger, le rose et la lavande
- les feuilles très souvent: l'eucalyptus, la menthe et le thym
- les organes souterrains: les racines (vétiver) et les rhizomes (gingembre, acore)
- les fruits: le fenouil, l'anis et l'épicarpe des citrus
- les graines: le noix de muscade
- le bois et les écorces: la cannelle, le santal et le bois de rose [68]

La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles sont généralement associées à la présence des structures histologiques spécialisées appelées : les glandes des huiles essentielles qui sont souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante [108].

Les figures 4 et 5 représentent des glandes sécrétrices des huiles essentielles.

Il existe trois types de structure sécrétrice dans la plante:

- les poils sécréteurs des *Lamiaceae*
- les poches sécrétrices des *Myrtaceae* ou des *Rutaceae*
- et les canaux sécréteurs des *Apiaceae* ou des *Astéraceae* [28,68].

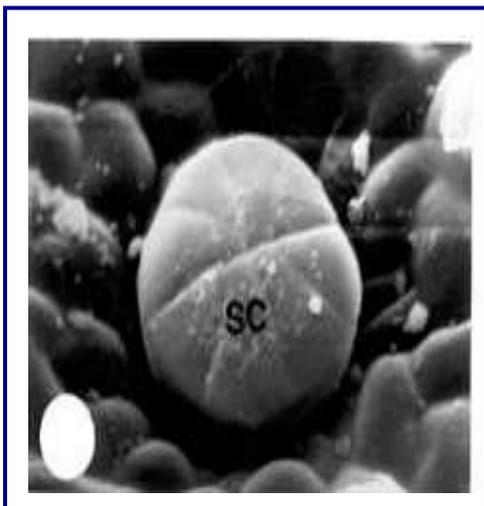


Figure 4: Glande simple entièrement chargée d'huile essentielle [108].

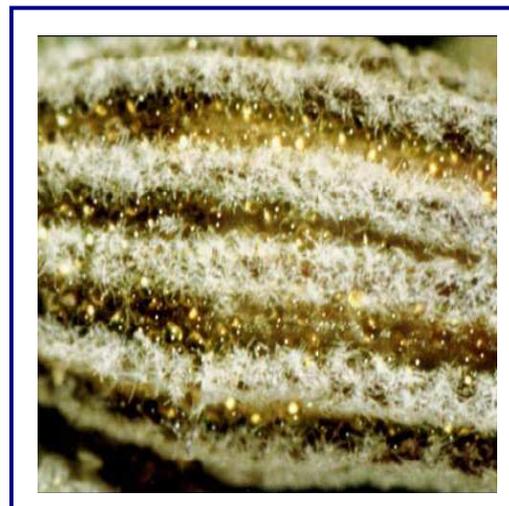


Figure 5: Poils épidermique sur le calice d'une fleur d'un origan [98].

1-4- Rôle physiologique

Beaucoup de plantes produisent les huiles essentielles en tant que métabolites secondaires mais leur rôle exact dans les processus de la vie de la plante est inconnu [102].

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

- la réduction de la compétition des autres espèces des plantes (Allélopathie) par l'inhibition chimique de la germination des graines.
- la protection contre la flore microbienne infectieuse par les propriétés fongicides et bactéricides et contre les herbivores par le goût et effet défavorables sur le système nerveux.
- Certains auteurs pensent que la plante utilise les huiles essentielles pour repousser ou attirer les insectes dans ce dernier cas pour favoriser la pollinisation [98,68].

1-5- Facteurs de variabilité

La composition chimique et le rendement en huiles essentielles varient suivant diverses conditions tels que: l'environnement, le génotype, l'origine géographique, la période de récolte, le séchage, lieu de séchage et la contamination par des parasites, des virus et des mauvaises herbes. C'est ainsi que l'action des huiles essentielles est le résultat de l'effet combiné de leurs composés actifs et inactifs, ces composés inactifs pourraient influencer la disponibilité biologique des composés actifs et plusieurs composants actifs pourraient avoir un effet synergique [111,115].

1-6 - Méthodes d'extraction [94, 106, 112, 125, 128].

Parmi les divers procédés d'extraction des huiles essentielles deux seulement sont admis par la pharmacopée française ainsi que par l' A.F.N.O.R et I.S.O :

- l'extraction par entraînement à la vapeur
- l'extraction par expression (pressage)

1-6-1- Extraction par entraînement à la vapeur d'eau

La plupart des huiles essentielles sont obtenues par distillation et entraînement à la vapeur d'eau, trois variantes sont possibles selon la texture et la fragilité de la matière première à traiter.

1-6-1-1- Hydrodistillation simple

C'est la méthode la plus employée pour extraire les huiles essentielles.

La plante est mise en contact avec l'eau dans un ballon lors d'une extraction au laboratoire ou dans un alambic industriel, le tout est en suite porté à l'ébullition. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et les huiles se séparent de l'eau par différence de densité.

La figure 6 montre le montage à hydrodistillation simple.

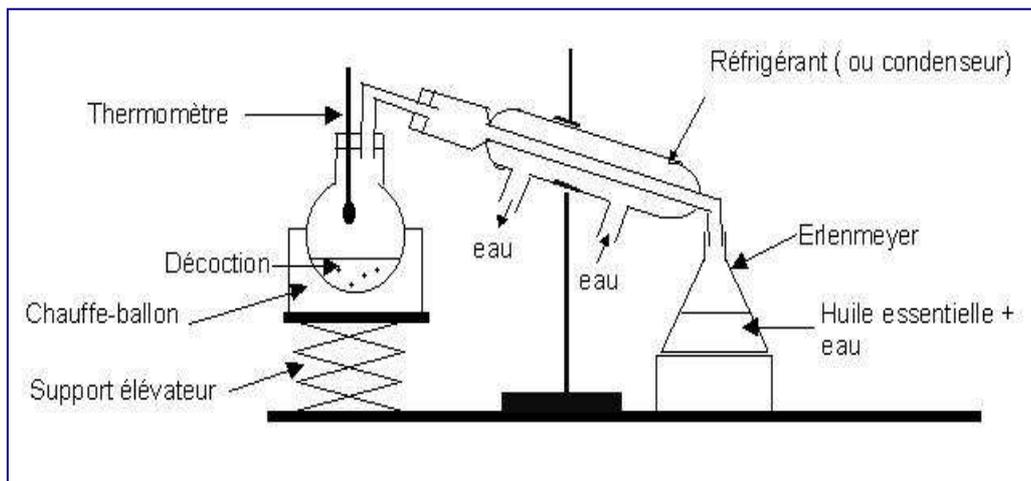


Figure 6 : Montage à hydrodistillation simple

1-6-1-2- Entraînement à la vapeur sèche

Pour éviter certains phénomènes d'hydrolyse sur des composants de l'huile essentielle ou des réaction chimiques pouvant altérer les résultats, le procédé de l'entraînement à la vapeur sèche a été mis au point. La masse végétale repose sur une grille vers la quelle la vapeur sèche d'eau est pulsée, les cellules se distendent et les particules d'huile se libèrent, les composés d'huile volatils entraînés par la vapeur d'eau vont pouvoir être séparés par décantation du distillat refroidi.

1-6-1-3- Hydrodiffusion

Elle consiste à faire passer un courant de vapeur d'eau à très faible pression à travers la masse végétal. La composition des produits obtenus est sensiblement différente au plan qualitatif de celle des produits obtenus par les méthodes précédentes.

1-6-2- Extraction par expression

C'est une technique simple où le matériel végétal est pressé mécaniquement à froid pour extraire son huile essentielle, cette méthode est essentiellement utilisée pour recueillir les huiles essentielles des épicarpes de citrus (citrons, orange, mandarines et pamplemousses).

Autres procédés

D'autres procédés sont utilisés le plus souvent pour les plantes délicates qui ne supportent pas la chaleur :

- **enfleurage**

Cette méthode consiste à mettre le matériel végétal en contact à la température ambiante avec un corps gras (saintoux) qui se sature en essence au bout de quelques jours. La pommade obtenue est épuisée par l'alcool absolu (dans lequel les corps gras sont très peu solubles), l'alcool est ensuite évaporé sous vide.

- **extraction par solvants volatils**

Cette méthode consiste à dissoudre l'huile essentielle dans un solvant non miscible avec l'eau où se trouve le matériel végétal et à séparer la phase organique contenant l'huile recherchée de la phase aqueuse. Le solvant est ensuite évaporé.

- **extraction au CO₂ supercritique**

L'originalité de cette technique repose sur le solvant utilisé, il s'agit du CO₂ en phase supercritique, à l'état supercritique, le CO₂ n'est ni liquide ni gazeux et cela lui confère un excellent pouvoir d'extraction modulable à volonté en jouant sur la température et la pression de mise en œuvre. Les avantages de ce procédé c'est que à la fin de l'extraction l'abaissement de la pression provoque le passage du gaz carbonique de l'état supercritique à l'état gazeux et le CO₂ s'élimine tout seul de l'extrait.

Ces trois dernières techniques permettent d'obtenir des extraits de plantes qui théoriquement ne s'appellent plus huiles essentielles bien que très proches du point de vue chimique; ce sont les essences concrètes, les résinoïdes et les absolues, ces dernières sont des produits d'extraction des concrètes et des résinoïdes par l'alcool éthylique, la solution éthanolique est filtrée puis distillée, le résidu c'est l'absolu [68].

1-7- Activités biologiques et mode d'action

Les différents composants des huiles essentielles couvrent un spectre d'action extrêmement large

1-7-1- Activité antimicrobienne

La majorité des huiles essentielles ont un spectre d'action très large dont leurs terpènes ou terpénoïdes ont des effets contre les bactéries, les mycètes, les virus et les protozoaires.

Les huiles essentielles exercent son pouvoir antimicrobien par :

- leur interférence avec la bicouche lipidique de la membrane de la cellule grâce à leur propriété hydrophobe ce qui entraîne une perturbation de la cellule [29,39].
En plus cette réaction varie en fonction de la nature de la bicouche lipidique ce qui explique la résistance des bactéries à Gram négatif [86].
- destruction de certains systèmes enzymatiques incluant ceux qui participent dans la production d'énergie cellulaire et la production des composés structuraux [39,83].
- inactivation et destruction du matériel génétique du micro-organisme [83,86].

1-7-2- Activité antioxydante

Un antioxydant est défini comme étant toute substance qui peut retarder ou empêcher l'oxydation des substrats biologiques, ce sont des composés qui réagissent avec les radicaux libres et les rendent ainsi inoffensifs. La capacité antioxydante des huiles essentielles est étroitement liée à tout le contenu phénol [18, 25,114].

1-7-3- Activités diverses

Les huiles essentielles agissent par le biais de leur fraction lipophile en réagissant avec les lipides de la membrane cellulaires et en conséquence de modifier l'activité des canaux ioniques de calcium. A certain niveau de concentration, les huiles essentielles saturer les membranes et montrent des effets similaires à ceux des anesthésiques locaux. Elles peuvent interagir aussi avec les membranes cellulaires par le biais de leurs propriétés physicochimiques et leurs formes moléculaires en influençant l'activité des : enzymes,

transporteurs, canaux ioniques et des récepteurs conduisant à une très large éventail des activités biologiques tels que: activités antispasmodiques, sédatives, anti-inflammatoire, myorelaxant, immunomodulateur, antidépresseur, stimulant le système nerveux centrale et hypothermique [111,115].

Matériels et Méthodes



1- Matériels

1-1- Matériel biologique

1-1-1- Bulbes d'*Allium sativum*

Notre étude a porté sur les bulbes d'*Allium sativum* récoltés de la région d'El Harrouche de la wilaya de Skikda (Algérie) durant le mois de juin de l'année 2007, après la récolte la plante fraîche a été conservée à l'ombre dans un endroit sec et aéré.

La situation et la carte géographique de la région de la récolte sont illustrées dans le tableau 2 et la figure 10.

Tableau 2 : Situation géographique de la région de la récolte

Région	Altitude	Latitude	Longitude	Etat bioclimatique
El Harrouche	Entre 200 et 250m	36° et 37° N	6° et 7° W	Hiver: tempéré Été: chaud et sec

1-1-2- Souches bactériennes

Les souches bactériennes à tester sont représentées par :

- 52 souches de *P. aeruginosa* d'origine clinique
- Une souche de référence de *P.aeruginosa* ATCC 27853; cette souche nous a été fournie par l'institut Pasteur d'Alger dont son profil de résistance aux antibiotique est: Tic^S, Tim^S, Pip^S, Caz^S, Atm^S, Gm^S, Tm^S, Ofx^S et Cip^S [9].

1-2- Matériel du laboratoire

L'ensemble du matériel utilisé au laboratoire (milieux de culture, réactifs et appareillages) sera cité au sein des techniques au fur et à mesure de leurs utilisations.

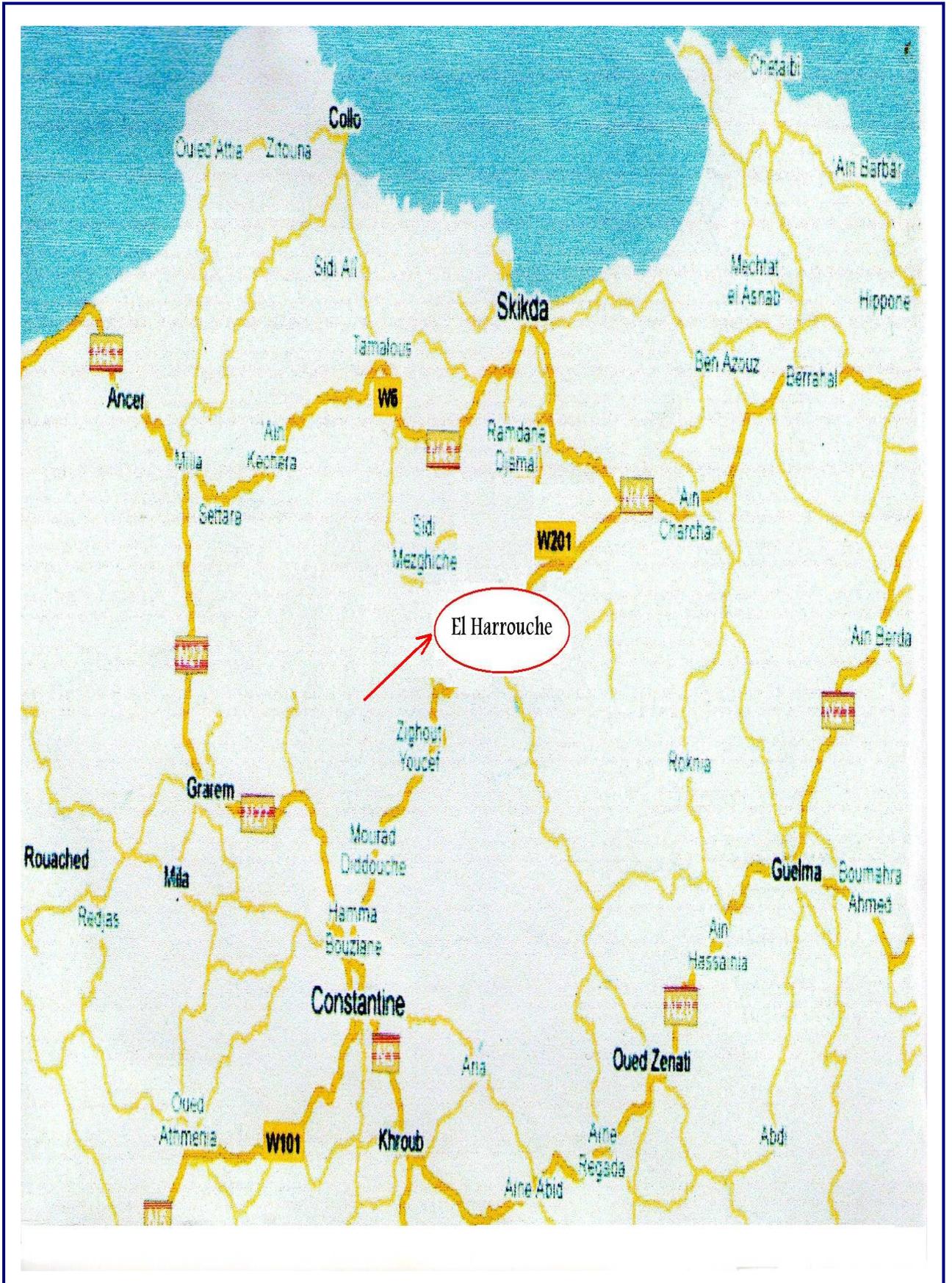


Figure 10: Carte géographique montre la région de la récolte [127].

2- Méthodes

2-1-Analyse chimique

2-1-1- Extraction

A partir des bulbes d'*Allium sativum* nous avons extrait l'huile essentielle par la méthode d'hydrodistillation. L'extraction a été effectuée au niveau du Laboratoire de Chimie Analytique au Département de Pharmacie à l'Université Badji Mokhtar Annaba.

2-1-1-1- Préparation du matériel végétal

Avant de commencer l'hydrodistillation nous avons procédé à faire macérer notre matériel végétal dans de l'eau distillé: 200g de bulbes d'*Allium sativum* ont été coupés en petits morceaux puis homogénéisés dans de l'eau distillé à l'aide d'un mélangeur pendant une minute à vitesse moyenne, l'homogénat obtenu est gardé pendant une heure en macération comme le montre la figure 11 [17].

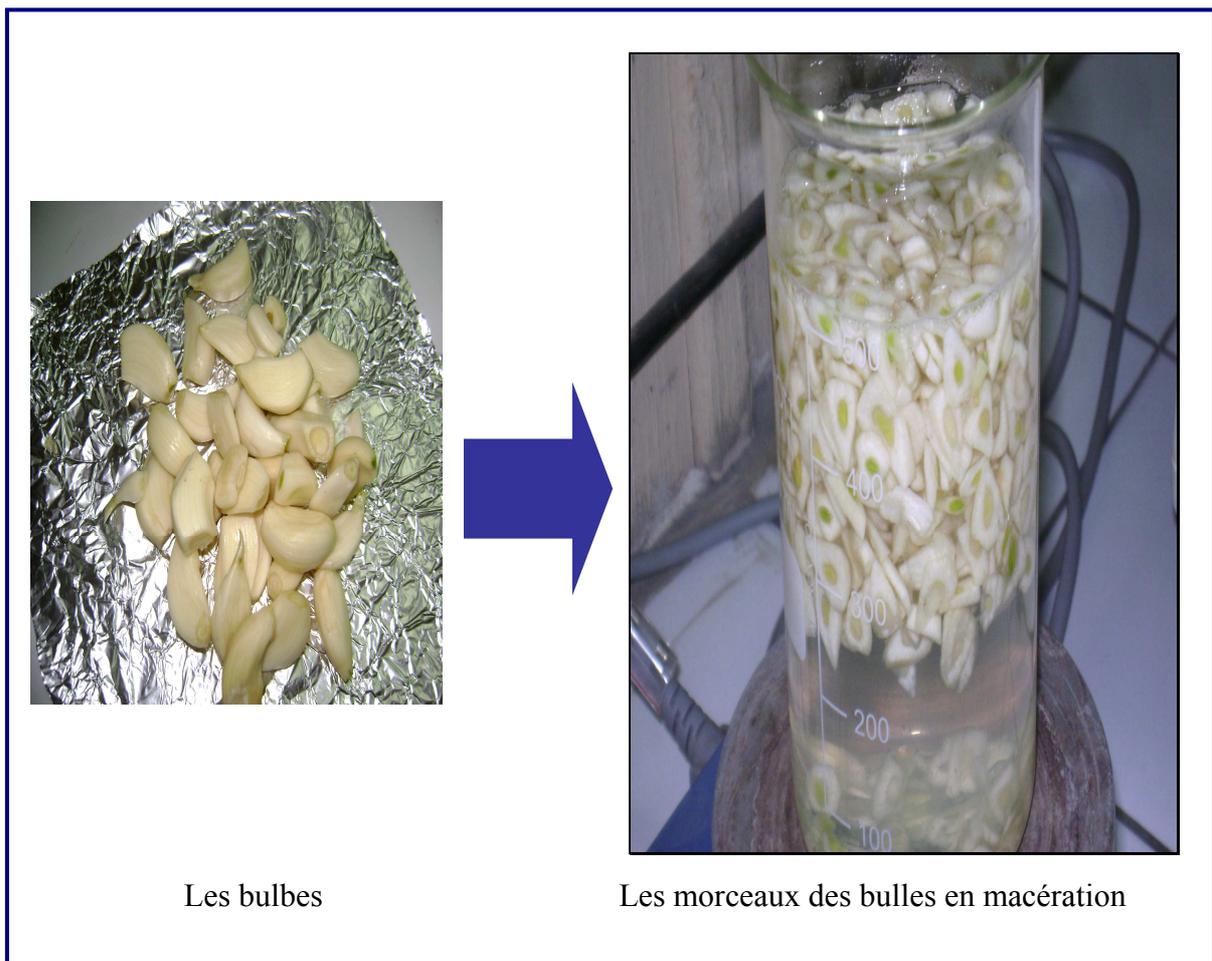


Figure 11: Préparation du matériel végétal

- But de la macération

La macération est nécessaire pour assurer la transformation de l'alliine (constituant major de l'ail frais non contusé) en allicine (précurseur principale de l'huile essentielle).

Les bulbes d'ail cultivé ne contiennent pas d'allicine puisque l'alliine et l'alliinase se trouvent dans des compartiments différents au sein des cellules de bulbe d'ail, quand ce dernier est coupé ou bien écrasé l'alliine entre en contact avec l'alliinase pour former l'allicine, l'acide pyruvique et l'ammoniac selon la réaction suivante [82,89]:

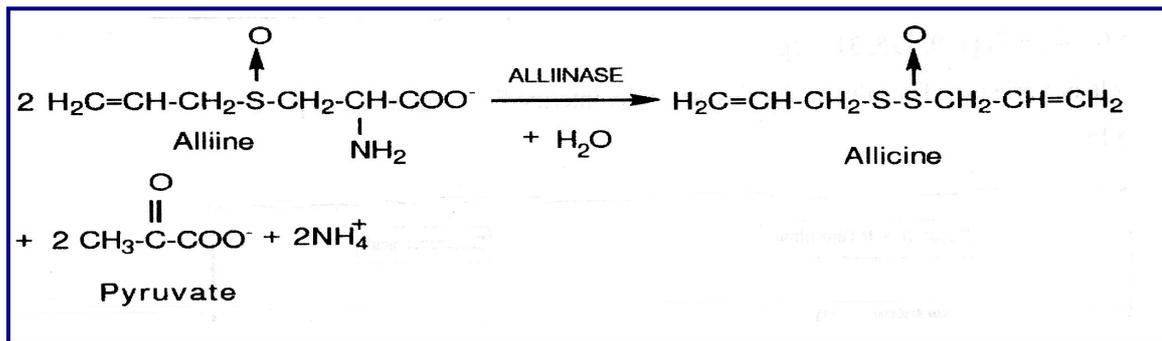


Figure12: Transformation de l'alliine en allicine [82,89].

La thermo décomposition de l'allicine est à l'origine de la naissance des sulfides volatils d'*Allium sativum* nommé: les dérivés de 2- propényl (allyl).

2-1-1-2- Hydrodistillation

Après une heure de macération l'homogénat est versé dans une fiole rondet de 1L puis porté à l'ébullition pendant 2 à 3 heures dans l'hydrodistillateur. La figure 13 montre l'hydrodistillateur employé dans l'extraction de l'huile essentielle.

Sous l'action de la chaleur, les cellules sécrétrices de l'huile essentielle éclatent et libèrent des composés organiques volatils. La vapeur d'eau formée vas entraîner avec elle les composés organiques à l'état gazeux vers le réfrigérant où ils vont se condenser et chutent dans une béccher. L'eau et l'huile essentielle se séparent par différence de densité en deux phases:

- **Phase organique:** huileuse et très odorante appelée " huile essentielle" contenant la majorité des composés odorants.
- **Phase aqueuse:** odorante appelée " eaux aromatiques" contenant que très peu des composés odorants [17, 94,106].

2-1-1-3- Séparation des deux phases

- Nous avons versé la totalité du distillat dans une ampoule à décanter et le laisser reposer.
- Lorsque les phases sont bien séparées, la phase organique a été récupérée dans des petits flacons.

L'huile essentielle séparée de l'eau aromatique est séchée par le sulfate de magnésium anhydre puis conservée à 4°C sous l'abri de la lumière jusqu'à son usage [64,73].



Figure 13 : Montage d'hydrodistillation employé pour l'extraction de l'huile essentielle.

2-1-2- Calcul du rendement

Le rendement en huile essentielle est le rapport de la quantité d'huile recueillie après hydrodistillation sur la quantité de la plante à traiter exprimé en pourcentage [32].

Le rendement est calculé par la formule suivante :

$$R = P_B / P_A \times 100$$

R : rendement de l'huile essentielle en %

P_B: quantité de l'huile essentielle en g

P_A : quantité de la plante en g

2-1-3- Mesure de la densité

La densité relative de l'huile essentielle est le rapport de la masse d'un certain volume de l'huile à 20°C et la masse d'un égal volume de l'eau distillée à 20°C [1].

2-1-4- Analyse de la composition chimique

La composition chimique de notre huile essentielle a été déterminée par la technique de Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CPG/MS). Cette analyse a été effectuée au niveau du Laboratoire de Synthèse et Bio-catalyse Organique au Département de Chimie à l'Université Badji Mokhtar Annaba.

2-1-4 -1- Principe de la technique

En chromatographie en phase gazeuse (CPG), l'échantillon est vaporisé et injecté au sommet de la colonne, l'élution est assurée par un flux de gaz inerte qui sert de phase mobile [78].

Le principe de la séparation repose sur une différence de répartition des composés d'un mélange entre deux phases; la phase mobile et la phase stationnaire imprégnée dans la colonne. Les composants du mélange injecté dans la colonne et poussé dans celle-ci par le gaze vecteur interagissent différemment avec la phase stationnaire et de ce fait leur progression dans la colonne se fera pas à la même vitesse. Ce phénomène d'interaction provoque ainsi la séparation des constituants du mélange.

Un système de détection adéquate en sortie de colonne permet de créer un signal qui est enregistré sous forme de " pics chromatographiques"[74].

La spectrométrie de masse (SM) permet d'aboutir à la détermination de la structure des analytes [22].

2-1-4-2- Conditions opératoires

L'analyse a été faite à l'aide d'un chromatographe couplé d'un spectromètre de masse de type Shimadzu 2010 équipé d'une colonne capillaire OV17X.

Les conditions opératoires sont les suivantes:

- gaze vecteur : hélium
- température de l'injection : 220°C
- programmation de température : 60 à 250°C à raison de 3°C/min
- mode d'injection : Split

L'identification des différents constituants est réalisée à partir de leurs spectres de masse en comparaison avec ceux des composés standard de la banque de données informatisée NIST 98.

2-2- Analyse microbiologiques

2-2-1- Provenance des souches

Au total 52 souches de *Pseudomonas aeruginosa* ont été isolées à partir de divers produits pathologiques provenant de différents services hospitaliers appartenant au deux Centre Hospitalo-Universitaires: CHU Dorban et CHU Ibn-Rochd durant la période du mois de décembre 2007 au mois d'avril 2008. L'origine des prélèvements des souches est montrée dans le tableau 3.

Tableau 3 : Origine des prélèvements des souches testées

Nombre des souches	Origine des prélèvements
21	Urines
18	Pus
9	Secrétions pulmonaires
4	Hémocultures

2-2-2 - Vérification de la pureté des souches

A partir du milieu de conservation, un isolement des souches a été effectué sur gélose au cétrimide dans un but de la vérification de leur pureté, l'incubation a été réalisée à 30°C pendant 18 à 24 h ensuite ont été effectués :

2-2-2-1- étude microscopique

2-2-2-1-1- examen à l'état frais

L'état frais permet d'observer des bactéries vivantes et apporte des renseignements sur la morphologie, le mode de groupement et la mobilité [30].

2-2-2-1-2- examen après coloration de Gram

La coloration de Gram est basée sur la différence de perméabilité des bactéries à l'alcool donc sur leur capacité à retenir dans leur cytoplasme et leur paroi un colorant primaire qui est le violet de Gentiane. Cette différence de perméabilité est liée à une différence de structure chimique des parois cellulaire entre deux grands groupes de bactéries: bactéries à Gram négatif et bactéries à Gram positif; celles qui retiennent le violet de Gentiane après l'action de l'alcool sont dites à Gram positif, celles qui sont décolorées et prennent ensuite la couleur d'un second colorant qui est la fuschine sont dites à Gram négatif [30, 31,76].

2-2-2-2- étude des caractères cultureux

Les caractères cultureux qui ont été étudiés sur la gélose au cétrimide et sur la gélose nutritive sont :

- l'aspect des colonies (la taille, la transparence, la consistance et l'élévation de la colonie).
- la mise en évidence de la pigmentation
- et la présence ou l'absence d'une odeur caractéristique de fleur de seringa [30, 31,52].

2-2-3 - Identification biochimiques des souches

Après confirmation de la pureté des souches une identification biochimique a été réalisée dans la quelle nous avons effectué:

- une recherche de l'enzyme respiratoire (Oxydase)
- une mise en évidence de la production des pigments spécifiques
- et une étude des caractères biochimiques par la galerie API 20NE

2-2-3-1- Recherche de l'enzyme respiratoire (Oxydase)

2-2-3-1-1- Principe

L'oxydase est une enzyme qui intervient dans la chaîne respiratoire des bactéries aérobies.

Le test d'oxydase permet de mettre en évidence la phénylène diamine oxydase des bactéries à partir de leur culture en milieu gélosé.

2-2-3-1-2- Mode opératoire

- Déposer sur une lame porte objet propre un disque d'oxydase " ox" et l'imbiber avec une goutte d'eau distillée ou d'eau physiologique stérile.
- Prélever une partie de la colonie à étudier à partir d'une culture jeune sur gélose à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée stérile et l'étaler sur le disque.

- Lecture:

Une coloration violet foncé puis noire apparaît immédiatement ou en quelques secondes

 Test oxydase (+).

L'essai est négatif si la couleur n'a pas viré au violet dans les 10 secondes [30,31].

2-2-3-2- Mise en évidence de la production des pigments spécifiques

2-2-3-2-1- Principe

Les milieux King A et B sont destinés à la différenciation des espèces du genre *Pseudomonas* par la mise en évidence de leurs pigments.

L'élaboration des pigments est influencée par la composition du milieu.

- **Recherche du pyoverdine**

Le milieu King B est destiné à favoriser la synthèse du pigment jaune vert fluorescent " la pyoverdine".

Ce pigment colore le milieu en vert fluorescent, soluble dans l'eau et insoluble dans le chloroforme.

Le phosphate acide de potassium permet d'inhiber la production de pyocyanine, le sulfate de magnésium fournit les cations nécessaires pour activer la production de la pyoverdine.

- **Recherche du pyocyanine**

Le King A favorise sélectivement la production de pyocyanine par la présence de certains acides aminés et d'ions inorganiques.

Ce pigment soluble dans l'eau et dans le chloroforme, colore en bleu le milieu de culture.

La pyoverdine de *P.aeruginosa* peut être produite en faibles quantités sur le milieu King A et le mélange de pyocyanine et pyoverdine conduit à l'obtention d'une couleur verte. L'adjonction de chloroforme dans le milieu permettra alors de révéler spécifiquement la pyocyanine.

Le milieu King A favorise également la synthèse d'autres pigments phénaziniques: pyorubine (pigment rose rouge) et pyomélanine (pigment brun foncé).

2-2-3-2-2- Mode opératoire

- Inoculer un tube de milieu King A et un tube de milieu King B en faisant une strie médiane à la surface de la gélose inclinée.
- Replacer la capsule sur chaque tube sans la revisser, puis incubé à 30°C pendant 1 à 4 jours.

- Lecture

- **Le milieu King A**

Les cultures sont colorées en bleu vert, en cas de doute, prélever à la pipette pasteur stérile l'eau de condensation puis verser 0.5 ml de chloroforme sur la culture, laisser pendant 10 à 15 minute en position inclinée.

La pyocyanine est soluble dans le chloroforme.

- **Le milieu King B**

Sur ce milieu, la pyoverdine se manifeste par une coloration verte-fluorescente visible à l'œil nu. L'examen des tubes sous une lampe émettant une lumière UV à la longueur d'onde de 365nm permet de vérifier la production du pigment fluorescent en comparaison avec un tube témoin non ensemencé.

Les tubes doivent être conservés pendant 2 à 3 semaines avant de pouvoir conclure que la production de pyoverdine est négative [14, 30, 31,47].

2-2-3-3- Etude des caractères biochimiques par la galerie API 20NE

L'étude des caractères biochimiques des souches a été réalisée par l'API 20 NE qui est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif comme les *Pseudomonas*.

2-2-3-3-1- Principe

L'API 20 NE est un système miniaturisé comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés, la suspension bactérienne répartie dans les microtubes dissout les substrats. Après incubation, les réactions sont mises en évidence par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs.

2-2-3-3-2- Mode opératoire:

Le mode opératoire de la galerie API 20 NE est présenté dans la figure 14.

- Préparation de la galerie

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5ml d'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Incrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.
- Retirer la galerie de son emballage individuel, la déposer dans la boîte d'incubation et jeter le dessicant.

- Préparation de l'inoculum

- Ouvrir une ampoule de NaCl 0.85% Medium (2ml) ou utiliser un tube contenant 2ml de la même solution sans additif

- Réaliser une suspension bactérienne de turbidité égale à celle de 0.5 de MacFarland; prélever pour cela 1 à 4 colonies de morphologie identique à l'aide d'une pipette par aspirations ou par touches successives.

Note: pour le bon fonctionnement des tests de la galerie API 20 NE, il est très important d'ajuster la densité de l'inoculum au point de 0.5 de Mac Farland. En particulier, une turbidité plus faible conduit à des résultats faussement négatifs.

Ne pas toucher les cupules lors des manipulations et veiller à ne pas laisser la galerie exposée à l'air longtemps après incubation.

- Inoculation de la galerie

- Remplir les tubes (et non les cupules) des tests NO_3 à PNPG avec la suspension précédente.
- Ouvrir une ampoule d'AUX Medium et y transférer 200 μl de la suspension précédente. Homogénéiser avec une pipette stérile.
- Remplir tubes et cupules des tests GLU à PAC.
- Remplir d'huile de paraffine les cupules des trois tests soulignés (GLU, ADH et URE) pour créer les conditions d'anaérobiose.
- Refermer la boîte d'incubation et incuber 24h à 30°C.

- Lecture de la galerie

La lecture de la galerie se fait en se référant au tableau n° 4 et l'identification est obtenue à l'aide du tableau d'identification et du catalogue analytique [31, 63,129].

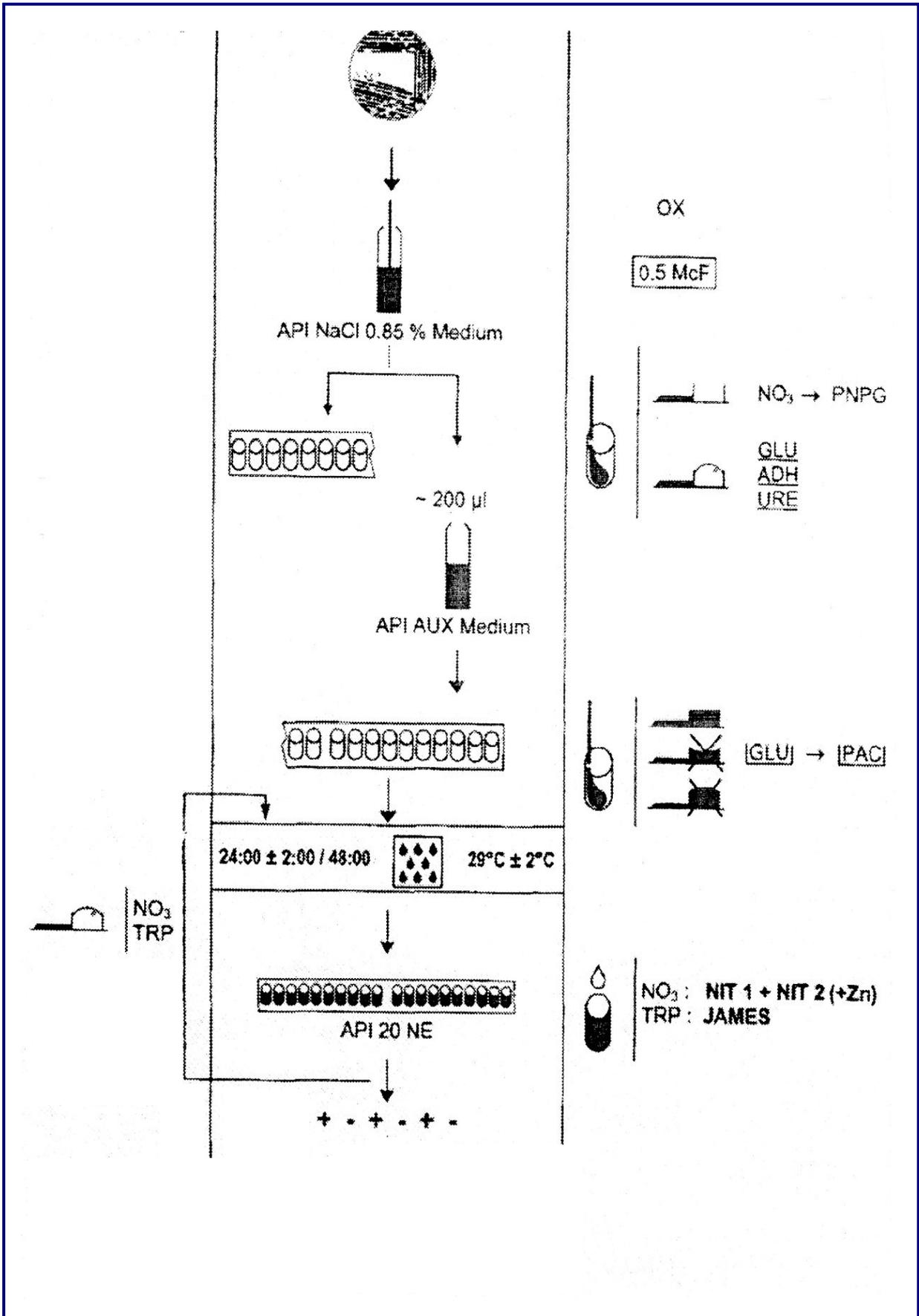


Figure 14: Mode opératoire de la galerie API 20NE [63,129].

Tableau 4: Table de lecture de la galerie API 20NE [31,130].

Tests	Composants actifs	QTE (mg/cup)	Réactions / enzymes	Résultats	
				négatif	positif
NO3	Potassium nitrate	0.136	Réduction des Nitrates en nitrites	NTT1+NTT2/5min Incolore rose rouge	
			Réduction des Nitrates en azote	Rose Zn/5mn incolore	
TRP	L- tryptophane	0.2	Formation d'indole (Tryptophane)	<u>JAMES / immédiat</u> Incolore rose Vert pâte/ Jaune	
GLU	D- glucose	1.92	Fermentation GLUCose)	Bleu à vert	Jaune
ADH	L-arginie	1.92	Arginine DIHydrolas	Jaune	Oranger/ Rose/rouge
UE	Urée	0.76	URE ase	Jaune	Oranger/ Rose/rouge
ESC	Esculine citrae de fer	056 0.072	Hydrolyse (B-glucosidase) (ESCuline)	Jaune	Gris / marron/noir
Gel	Gélatine (origine bovine)	0.6	Hydrolyse (protéase) (GELatine)	Pasde diffusion du pigment	Diffusion du pigment noir
PNPG	4-nitrophényl – BD- galactopyranoside	0.22	B- galactosidase (Para Nitrophényl- BD- Galactopyranosidase)	incolre	Jaune
GLU	D- Glucose	1.56	Assimilation (GLUCose)	Transparence	Trouble
ARA	L-arabinose	1.4	Assimilation (Arabinos)	Transparence	Trouble
MNE	D-mannose	1.4	Assimilation (Mannose)	Transparence	Trouble
MAN	D-mannitol	1.36	Assimilation (Mannitol)	Transparence	Trouble
NAG	N- Acétylglucosamine	1.28	Assimilation (N.acetyl- Glucosamine)	Transparence	Trouble
MAL	D-maltose	1.4	Assimilation (Maltose)	Transparence	Trouble
GNT	Potassium Gluconate	1.84	Assimilation (Potassium GluconatE)	Transparence	Trouble
CAP	Acide caprique	0.78	Assimilation (acideCaprique)	Transparence	Trouble
ADI	Acide adipique	1.12	Assimilation (acide adipique)	Transparence	Trouble
MLT	Acide malique	1.56	Assimilation (Malate)	Transparence	Trouble
CIT	Trisodium citrate	2.28	Assimilation (trisodium citrate)	Transparence	Trouble
PAC	Acide phénylacétique	0.8	Assimilation (acide phénylacétique)	Transparence	Trouble
OX	(voir notice du test Oxydase)		Cytochrome- oxidase	Voir notice du test oxydase	

2-2-4- Conservation des souches bactériennes

Les souches ont été conservées à 5°C après culture sur gélose nutritive inclinée en tube à essai.

2-2-5- Test de sensibilité aux antibiotiques: antibiogramme par méthode de diffusion en disque

2-2-5-1- Principe

C'est une méthode qui reflète l'aspect quantitatif de sensibilité bactérienne aux antibiotiques. Elle est d'un intérêt capital pour le clinicien qui doit établir ou rectifier une thérapie déjà entreprise.

Selon les recommandations de l'organisation mondiale de la santé on préconise d'adopter la méthode de disques selon la NCCLS.

2-2-5-2- Mode opératoire

- Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture pure de 18h sur milieu gélose nutritive racler à l'aide d'une anse de platine 3 à 5 colonies bien isolées et parfaitement identiques.

Décharger l'anse dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0.9%, bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0.5MacFarland c'est-à-dire d'une DO de 0.08 à 0.1 lue à 625 nm.

Note: L'ensemencement doit se faire dans les 15 minutes qui suivent la préparation de l'inoculum.

- Ensemencement

Le milieu Mueller-Hinton est fondu et refroidi à 45°C, coulé en boîte de pétri à une épaisseur de 0.4mm, après la solidification de la gélose tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne, l'essorer en le pressant fermement (en le tournant) sur la paroi interne du tube afin de le décharger au maximum. Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée de haut en bas en stries serrées. Répéter l'opération deux fois en tournant la boîte de 60 à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même, finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

Dans le cas où l'on ensemence plusieurs boîtes de pétri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.

- Application des disques d'antibiotiques

Les disques ont été placés dans les boîtes à l'aide d'une pince stérile.

Il ne faut pas mettre plus de 6 disques d'antibiotiques sur une boîte de 90mm de diamètre.

Les disques d'antibiotiques doivent être espacés de 24 mm centre à centre. L'incubation dure 18h à 30°C.

- Lecture

Mesurer en millimètre avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse métallique mais à défaut se munir d'une règle double décimètre à l'extérieur de la boîte fermée et comparer ces résultats aux valeurs critiques figurant dans la table de lecture (tableau 5) [33, 34, 100,113].

Classer la bactérie dans l'une des catégories: sensible, intermédiaire et résistante [6].

La figure 15 montre la technique de l'antibiogramme par la méthode de diffusion en Disque.

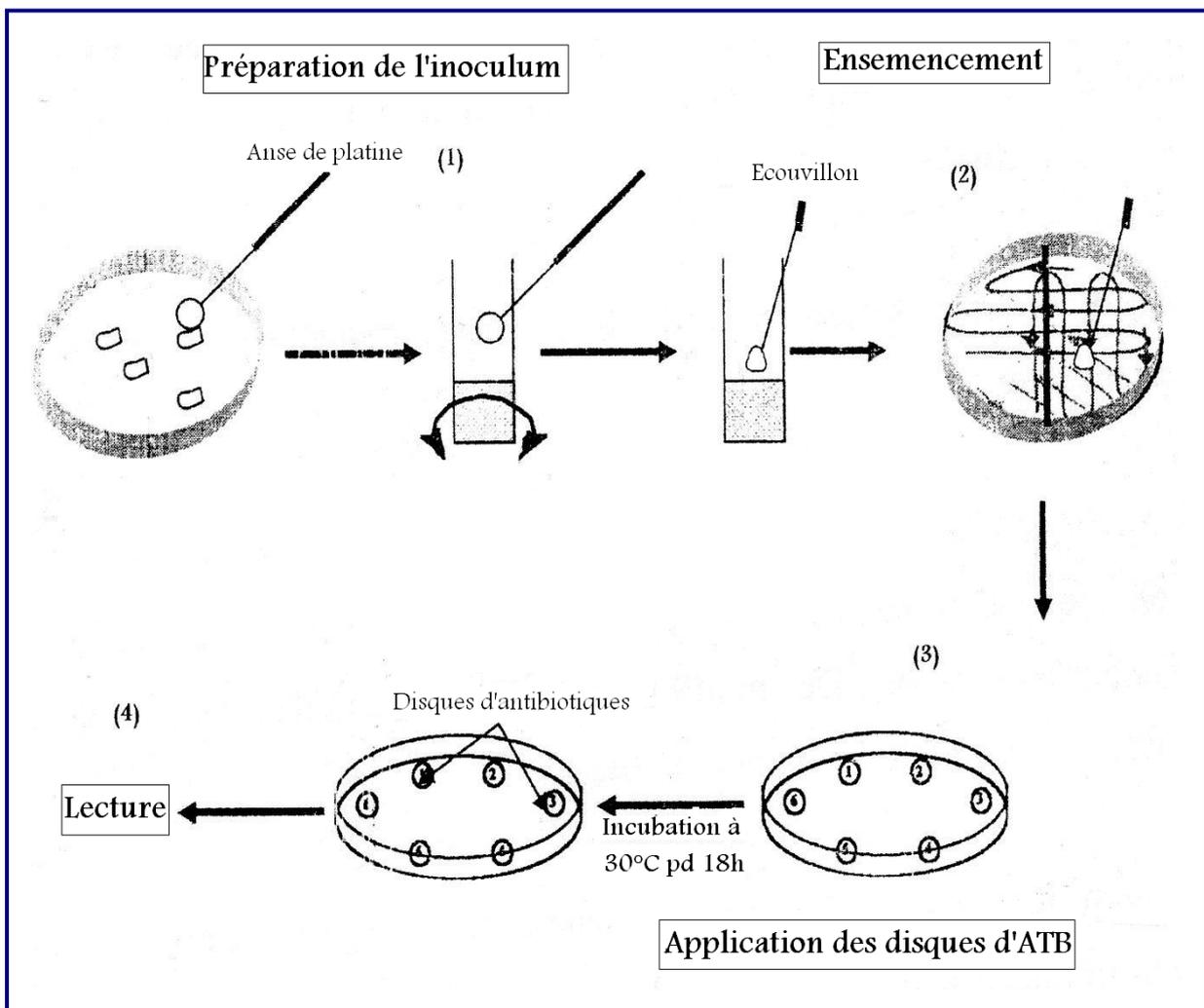


Figure 15: Technique de l'antibiogramme par la méthode de diffusion en disque

Tableau 5: Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour *P.aeruginosa* [33, 34, 100,113].

Antibiotiques testés		Sigle du disque	Charge du disque	Diamètres critiques (mm)		
				résistant	intermédiaire	Sensible
B- lactamines	Ticarcilline	TIC	75 µg	<18	17-21	≥ 22
	Tic+ac clavulanique	TCC	75+10 µg	<18	17-21	≥22
	Pipéracilline	PIP	100 µg	<12	13-19	≥20
	Ceftazidime	CAZ	30 µg	<15	14-20	≥ 21
	Céfépime	FEP	30 µg	<15	14-20	≥ 21
	Aztréonam	ATM	10 µg	<17	16-15	≥ 16
	Imipénème	IPM	10 µg	<17	16-22	≥ 23
Aminosides	Amikacine	AN	30 µg	<14	14-15	≥ 16
	Gentamicine	GM	10 µg	<15	14-16	≥ 17
	Tobramycine	TM	10 µg	<14	13-15	≥16
Quinolone	Ofloxacine	OFX	5 µg	<16	15-21	≥ 22
	Ciprofloxacine	CIP	5 µg	<19	18-21	≥ 22
	Fosfomycine	FOS	50µg	<14	-	≥14

2-2-6- Etude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle

Dans notre travail l'étude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle *d'Allium sativum* in vitro vis-à-vis de différentes souches de *P.aeruginosa* a été réalisée par deux méthodes:

2-2-6-1- Méthode de diffusion en disque : l'aromatogramme

2-2-6-1-1- Principe

L'aromatogramme est une méthode inspirée de l'antibiogramme qui permet de déterminer l'activité inhibitrice de croissance des huiles essentielles par la mesure du diamètre d'inhibition autour d'un disque de papier buvard ou de cellulose imprégné d'huile essentielle ou de produit à base d'huiles essentielles [19].

2-2-6-1-2- Mode opératoire

- Préparation de l'inoculum

L'inoculum a été préparé à partir d'une culture de 18h dans le bouillon nutritif par une première dilution dont son opacité doit être équivalente à 0.5MacFarland puis une deuxième dilution de 1/100 pour avoir 10^6 cfu/ml.

- Préparation de la solution mère de l'huile essentielle

Dans un flacon stérile contenant un volume bien déterminé d'eau distillée stérile nous avons ajouté une quantité bien définie de notre huile essentielle de façon à avoir une concentration égale à 2560 µg/ml.

Etant donné que l'huile essentielle est non miscible avec l'eau c'est pour cela une quantité de 2% (v/v) d'alcool éthylique à 95% (cette concentration a été choisie après un test préliminaire) et une quantité de 0.05 % (v/v) de tween 80 ont été ajoutés à la solution mère en vue d'obtenir un mélange homogène [73].

- Ensemencement

- Le milieu Mueller-Hinton est fondu et refroidi à 45°C, coulé en boîte de pétri à une épaisseur de 0.4mm.
- Après solidification, la surface de la gélose estensemencée par écouvillonnage avec l'inoculum.
- Un disque de papier Wathman de 6mm de diamètre stérile imprégné de la solution mère est placé à la surface de la boîte de pétri, un disque imprégné d'eau distillée stérile a été placé pour servir de témoin.
- Incuber à 30° C pendant 18 à 24 h.

Lecture :

La lecture des résultats se fait par la mesure de la zone d'inhibition qui est représentée par une auréole formée autour de disque où aucune croissance n'est observée [46,92].

2-2-6-2- Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par la méthode de dilution

2-2-6-2-1- Principe

Le principe de la méthode consiste à diluer l'huile essentielle dans un milieu de culture solide ou liquide et à inoculer ce milieu avec les souches bactériennes à tester [90].

2-2-6-2-2- Mode opératoire

- Préparation de la gamme de concentration de l'huile essentielle

Une gamme de concentration de notre huile essentielle allant de : 2560 μ g/ml à 10 μ g/ml a été préparée à partir de la solution mère selon la méthode de dilution en progression géométrique à raison de 2.

- Ensemencement

Dans notre travail nous avons appliqué les deux variantes de cette méthode.

2-2-6-2-2-1- Méthode de dilution en milieu liquide

- Les concentrations finales sont obtenues après addition dans les tubes à essais de 1ml de chaque dilution de l'huile essentielle et de 9ml de l'inoculum à 10⁶ cfu/ml.
- Après agitation, une quantité de 0.15% d'agar est ajouté pour chaque tube [87].
- Deux tubes témoins sans huile essentielle; un avec l'alcool éthylique et autre sans alcool ont été réalisés.
- Incuber les tubes à 30°C pendant 18 à 24h sous agitation permanente.

La figure 16 montre le protocole qui a été suivi pour la détermination de la CMI par la méthode de dilution en milieu liquide.

Lecture

La CMI sera donnée par la concentration de l'huile essentielle du premier tube qui ne montre pas une croissance (trouble) visible à l'oeil nu [5, 71].

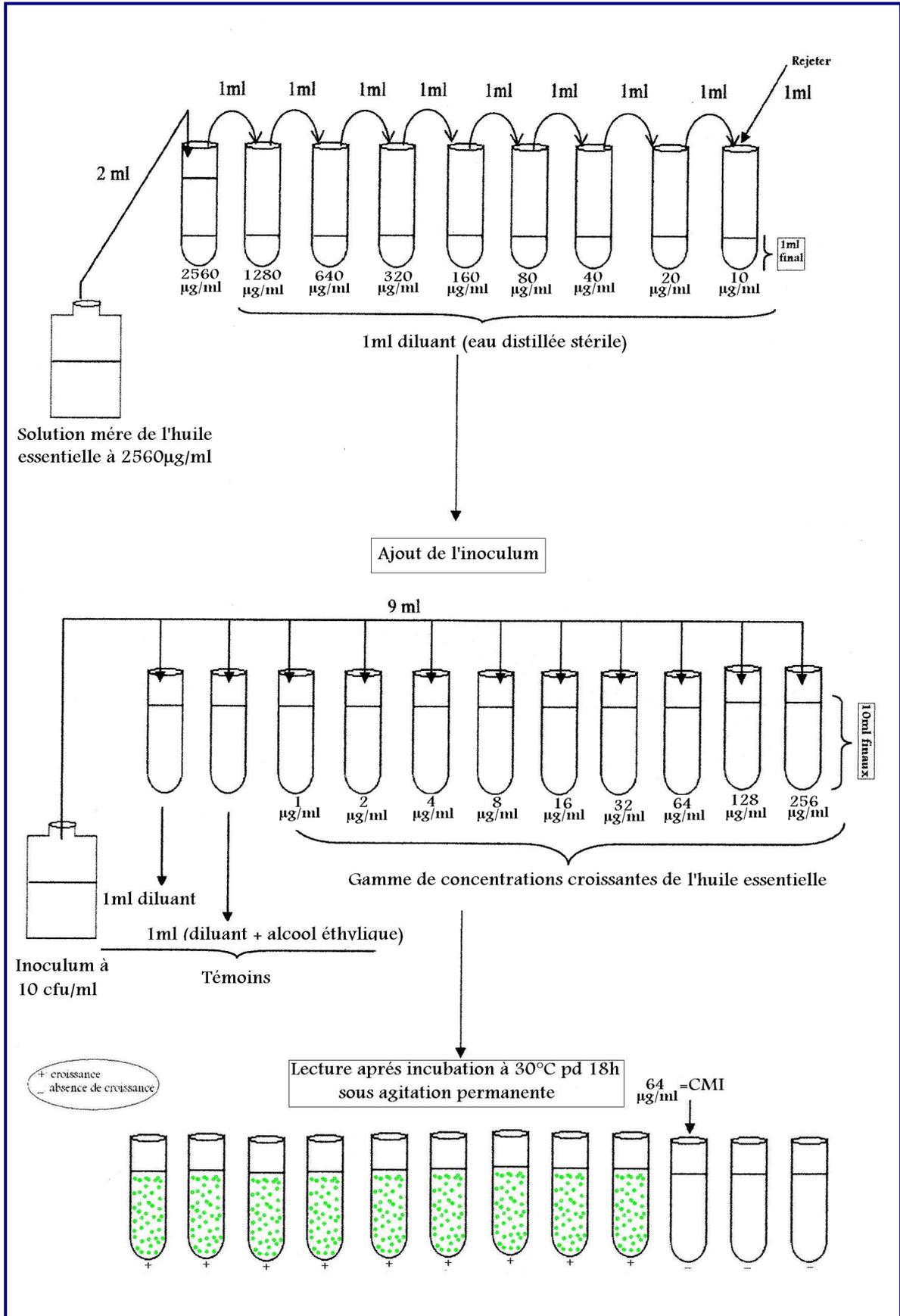


Figure 16: Détermination de la CMI par la méthode de dilution en milieu liquide

2-2-6-2-2-2- Méthode de dilution en milieu solide

- Dans cette méthode les concentrations finales sont obtenues après addition dans les tubes à essais 2ml de chaque dilution de l'huile essentielle à tester et de 18ml du milieu Mueller Hinton fondu (40°C).
- Après homogénéisation, chaque tube avec sa propre dose est coulé dans une boîte de pétri où la gélose va se solidifier. Deux boîtes sans huile essentielle; une avec alcool éthylique et autre sans alcool sont considérée comme des témoins.
- Après séchage, les boîtes sont ensemencées avec l'inoculum à 10^6 cfu/ml sous forme de stries parallèles à raison de 4 stries par boîte.
- Incuber les boîtes à 30°C pendant 18 à 24h.

La figure 17 montre le protocole qui a été suivi pour la détermination de la CMI par la méthode de dilution en milieu solide.

Lecture

La CMI sera donnée par la première des concentrations de l'huile essentielle qui inhibe sur la gélose toute culture apparente [5,73].

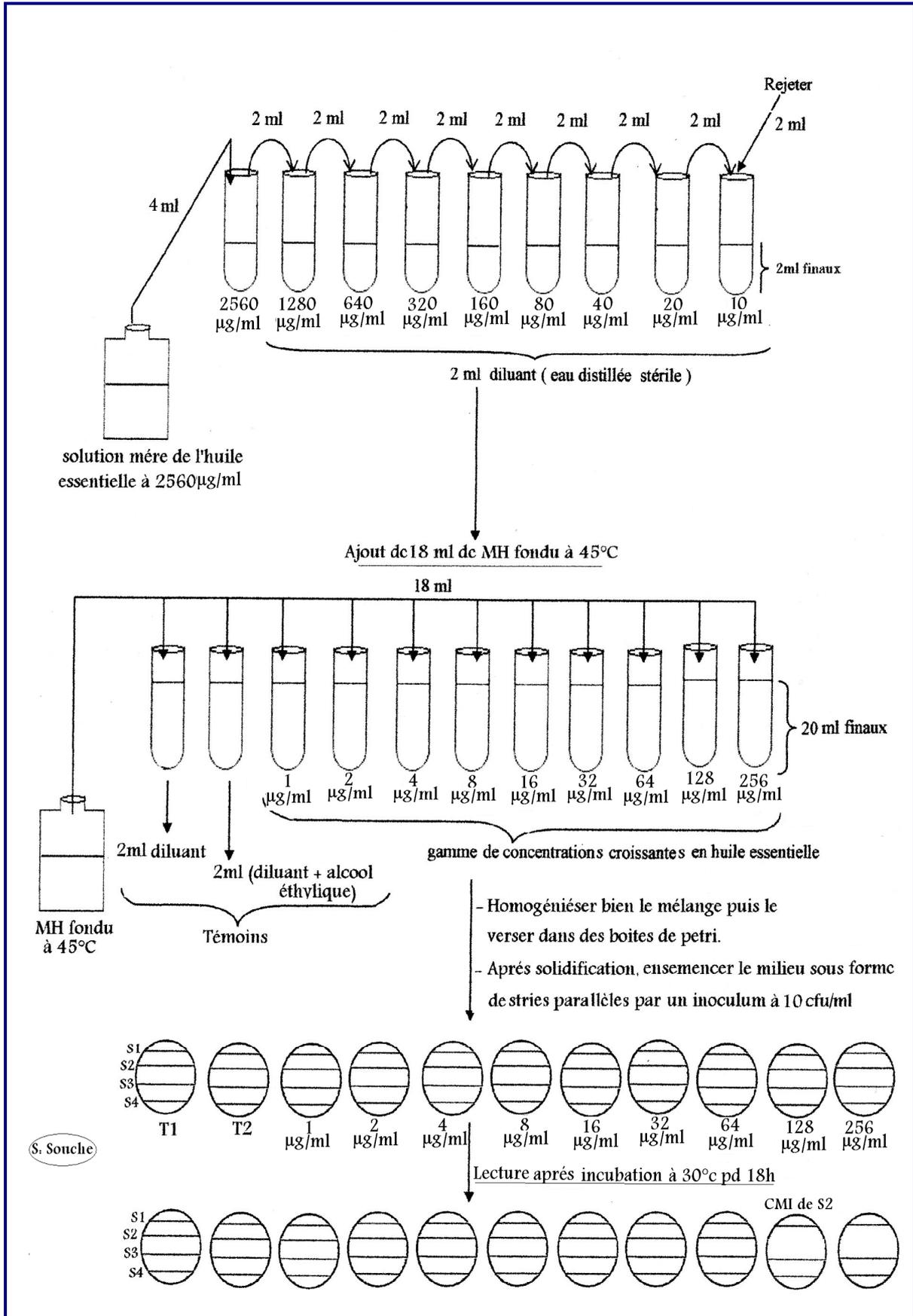


Figure 17: Détermination de la CMI par la méthode de dilution en milieu solide

2-2-6-3- Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)

La CMB est définie comme la plus faible concentration de l'agent antibactérien détruisant 99.9% de l'inoculum bactérien, ce qui correspond dans notre étude à un dénombrement bactérien inférieur à 10^2 cfu/ml après 24heurs d'incubation (Inoculum initial est de 10^6 cfu/ml).

Un volume de 0.1 ml de tous les tubes qui ne montrent pas de turbidité est subcultivé sur un milieu gélosé puis incubé à 30°C pendant 18h à 24h. La concentration minimale bactéricide correspond à la plus petite concentration de l'huile essentielle correspond à un dénombrement bactérien inférieur à 10^2 cfu/ml [6,56].

La figure 18 montre le protocole qui a été suivi pour la détermination de la CMB.

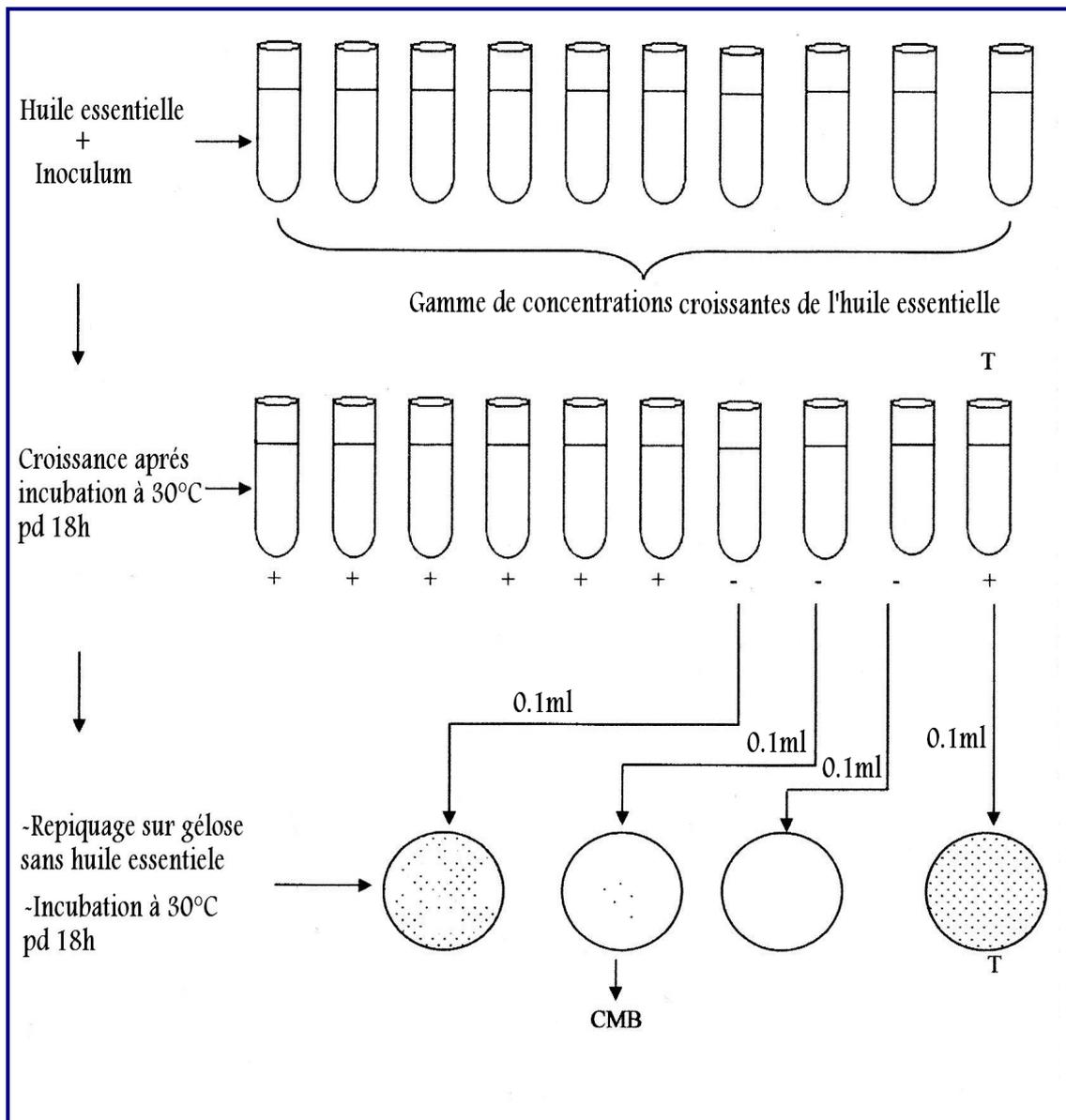


Figure 18: Détermination de la CMB.

Note: tous les essais ont été répétés trois fois

2-3- Etude statistique

Notre étude statistique a porté sur :

- le test " T" de student pour échantillon associé par paires pour faire comparer les deux méthodes de dilution.
- la détermination de l'écart types (erreur) des zones d'inhibition qui sont représentées par la moyenne plus ou moins l'écart types ($m \pm s$) ($n=3$).

Cette étude a été réalisée par le logiciel statistique Minitab version 13 dont la différence a été considérée significative à $p < 0.05$.

Résultats

1- Résultats de l'analyse chimique

1-1- Calcul du rendement

L'hydrodistillation des bulbes d'*Allium sativum* provenant de la région d'EL Harrouche de la wilaya de Skikda a donnée un rendement en huile essentielle égal à 0.09%.

Nous remarquons que la plante présente un rendement faible en huile essentielle ce qu'il nous a fallu de faire l'hydrodistillation à une quantité intéressante des bulbes (1kg) pour avoir une quantité d'huile suffisante à notre travail.

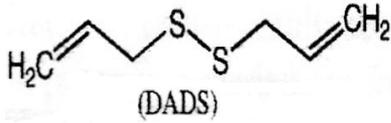
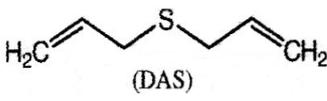
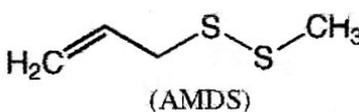
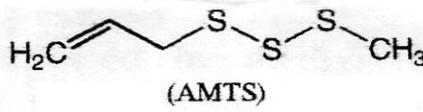
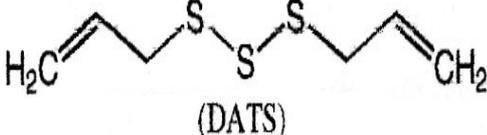
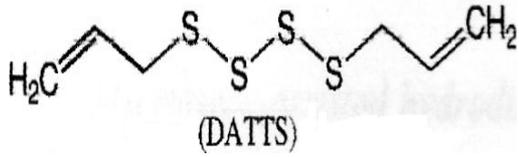
1-2- Mesure de la densité

La mesure de la densité relative de cette huile essentielle a révélé une densité égale à 1.028, elle est supérieure à celle de l'eau ce qui a permis à l'huile de se descendre au dessous de l'eau lors de l'extraction.

1-3- Analyse de la composition chimique

Les résultats de l'analyse chimique de l'huile essentielle par la méthode de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM) sont consignés dans le tableau 6 et la figure 19 :

Tableau 6 : Composition chimique de l'huile essentielle d'*Allium sativum*

Composés	Temps de rétention (mn)	Structures chimiques
1- Diallyl disulfide	3.823	 (DADS)
2- Diallyl sulfide	4.024	 (DAS)
3- Allyl méthyl disulfide	4.588	 (AMDS)
4- Allyl méthyl trisulfide	6.868	 (AMTS)
5- Diallyl trisulfide	10.605	 (DATS)
6- Diallyl tétrasulfide	22.120	 (DATTS)
7- NI	22.200	
8- NI	23.056	

NI: Non Identifier

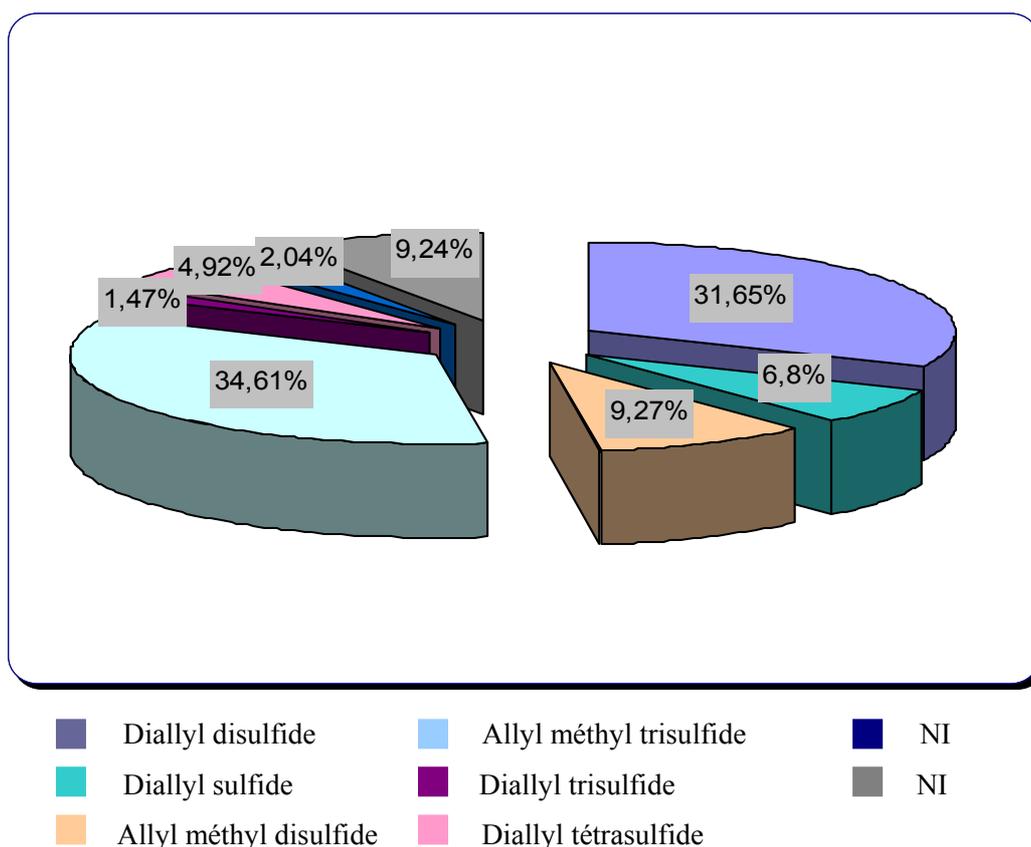


Figure 19 : Distribution en pourcentage des différents composants de l'huile essentielle d'*Allium sativum*

D'après les résultats de l'analyse chimique nous constatons que la méthode de CPG/SM a permis d'identifier huit composants constitués presque 100% des composés sulfides avec des pourcentages différents dont l'allyl méthyl trisulfide (34.61%) et le diallyl disulfide (31.65%) constituent les composants majoritaires de cette huile essentielle alors que les autres composants identifiés sont d'un pourcentage relativement faible: allyl méthyl disulfide (9.27%), diallyl sulfide (6.8%), diallyl trisulfide(1.47%) et diallyl tétrasulfide(4.92%).

2- Résultats de l'analyse microbiologique

2-1- Étude microscopique

2-1-1- Examen à l'état frais

L'état frais a montré la présence de bacilles droits, fins et mobiles

2-1-2- Examen après coloration de Gram

Après coloration de Gram l'observation microscopique a révélé la présence des bacilles de couleur rose donc bacilles à Gram négatif, isolés, parfois associés en diplobacilles.

La figure 20 illustre l'aspect microscopique de *P.aeruginosa* après coloration de Gram.

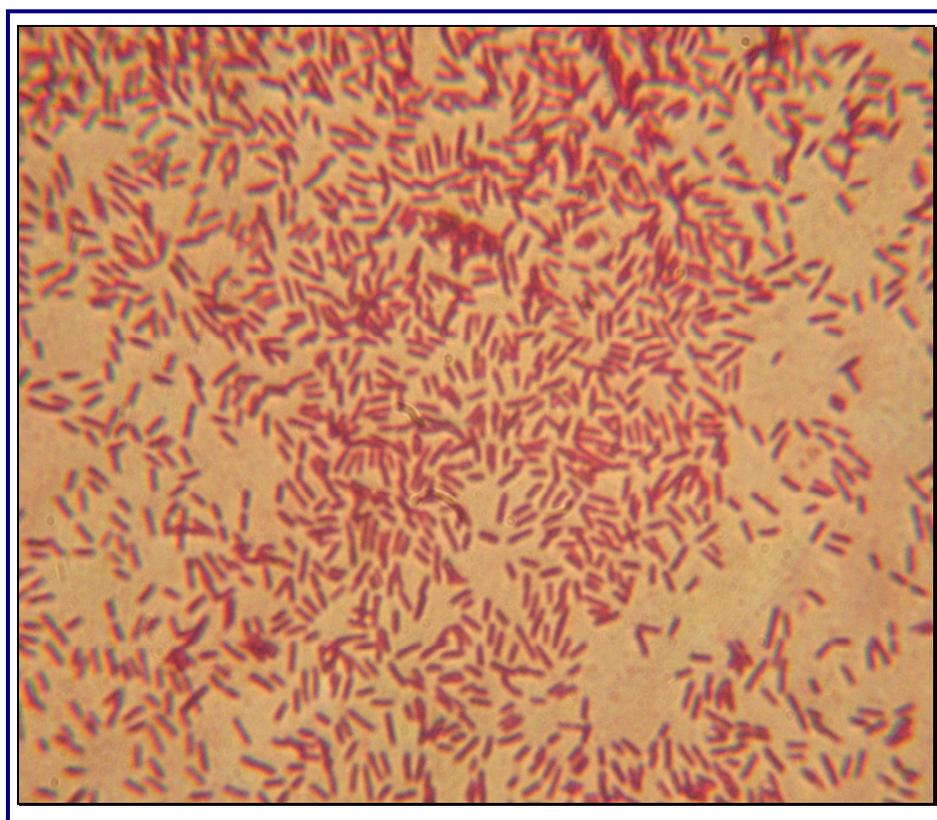


Figure 20 : Aspect microscopique de *P.aeruginosa* après coloration de Gram

2-2- Caractères cultureux

2-2-1- Sur gélose nutritive

Toutes les souches de *P.aeruginosa* étudiées se sont développées sur la gélose nutritive en diffusant une coloration verte et dégageant une odeur caractéristique de la pyocyanine. Les colonies sont de tailles moyennes, rondes, lisses, bombées, à contour régulier, certaines souches présentent un aspect muqueux.

2-2-2- Sur gélose au cétrimide

En plus des caractères cultureux de celle de la culture sur gélose nutritive, les souches de *P.aeruginosa* diffusants une coloration verte fluorescente.

Les figures 21 et 22 représentent l'aspect macroscopique des colonies respectivement sur la gélose nutritive et la gélose au cétrumide.

Les résultats de l'observation macroscopique et microscopique des souches de *P.aeruginosa* étudiées confirment leur pureté.



Figure 21 : Aspect macroscopique des colonies de *P.aeruginosa* sur gélose nutritive



Figure 22 : Aspect macroscopique des colonies de *P.aeruginosa* sur gélose au cétrimide.

2-3- Identification biochimique

2-3-1- Recherche de l'oxydase

Le teste d'oxydase de toutes les souches étudiées a révélé l'apparition d'une coloration violette foncée donc elles sont toutes des oxydases positifs.

2-3-2- Mise en évidence d'une pigmentation spécifique

Nous avons constaté l'apparition d'une couleur bleue sur le milieu King A signifiant la présence de pyocyanine caractéristique de *P.aeruginosa* et une couleur jaune-verte fluorescent sur le milieu King B ⇒ présence de pyoverdine.

2-3-3- Etude des caractères biochimiques par la galerie API 20NE

Les résultats de l'étude des caractères biochimique par la galerie API 20NE de toutes les souches testées répondent réellement au profil numérique spécifique à l'espèce *P.aeruginosa*. Les caractères biochimiques des souches testées de *P.aeruginosa* sont représentés sur la fiche des résultats du système API 20NE figure 23.

		CE 07224 B REF : _____ / _____ / _____ Origine / Source / Herkunft / Origen / Origen / Προέλευση / Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :	BIOMÉRIEUX
24 h 48 h	NO ₃ TRP GLU ADH URE ESC GEL PNG GLU IARA IMNE IMAN INAG IMAL IGNT ICAP IADL IMIL ICIT IPAC OX	1 2 4 1 2 4 1 2 4 1 2 4 1 2 4 1 2 4 1 2 4	1 1 5 4 5 6 5
Autres tests / Other tests / Andere Tests / Otras pruebas / Altri test / Outros testes / Άλλες εξετάσεις / Andra tester / Andre tests / Inne testy :		1154564	Ident. / Ταυτοποίηση : <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Figure 23: Fiche des résultats du système API 20NE de *P.aeruginosa*.

2-4- Test de sensibilité aux antibiotiques: antibiogramme

Les résultats de l'antibiogramme par la méthode de diffusion en disque des 53 souches testées sont représentés dans le tableau 9 et la figure 24.

Tableau 7: Résultats de la sensibilité aux antibiotiques des souches testées de *P.aeruginosa*

Antibiotiques testés	Abréviation	Pourcentage des souches		
		Résistantes	Intermédiaires	Sensibles
Ticarcilline	TCC	30.18%	15.09%	54.17%
Ticarcilline/Ac clavulanique	TIC	44.00%	16.98%	39.62%
Pipéracilline	PIP	20.75%	16.98%	62.26%
Ceftazidime	CAZ	15.09%	11.32%	73.58%
Imipénèm	IPM	9.43%	5.66%	84.90%
Aztréonam	ATM	20.75%	20.75%	58.49%
Gentamicine	GN	32.07%	28.30%	39.62%
Tobramycine	TM	26.41%	28.30%	45.28%
Amikacine	AM	22.64%	13.20%	64.15%
Ciprofloxacine	CIP	33.96%	5.66%	60.37%
Pefloxacine	PEF	41.50%	22.64%	35.84%
Fosfomycine	FOS	37.73%	24.52%	37.73%

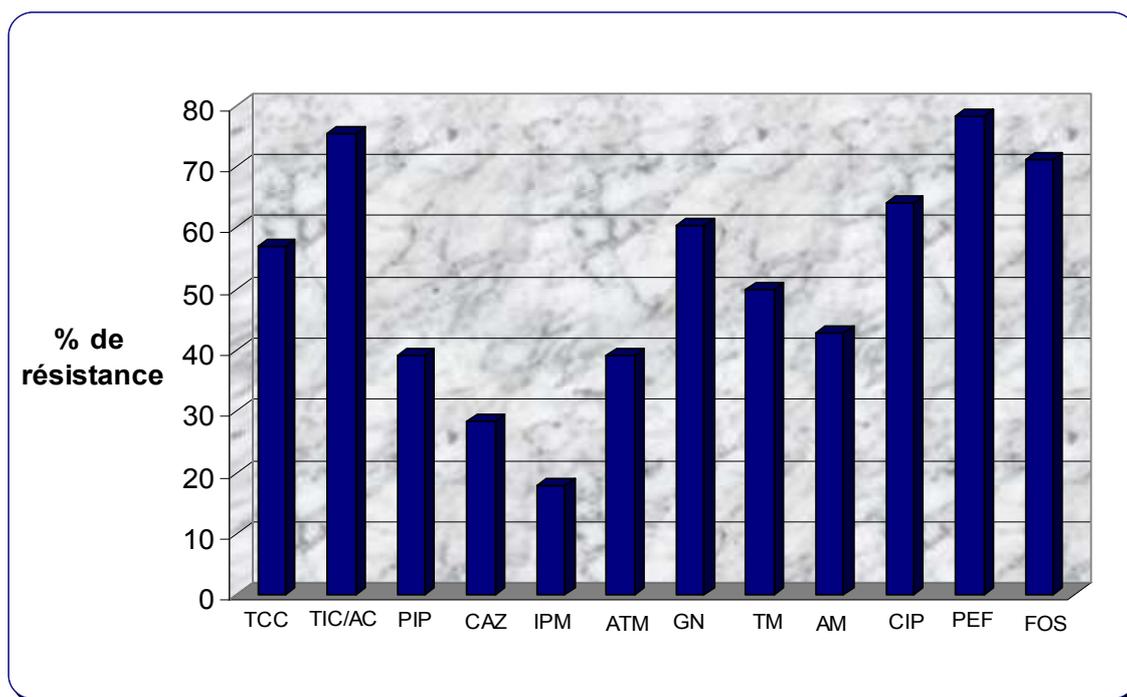


Figure 24 : Pourcentage de résistance aux antibiotiques des souches testées

D'après les résultats obtenus nous soulignons une très large variabilité dans la réponse des souches de *P.aeruginosa* étudiées vis-à-vis des antibiotiques testés.

La sensibilité des souches aux B-lactamines a montré une activité accrue de l'imipénème sur la plupart des souches étudiées avec un pourcentage de 84.90%, suivi de la ceftazidime 73.58%, la pipéracilline 62.26% et en fin l'aztréonam avec 58.49% des souches sensibles.

L'association ticarcilline/acide clavulanique a révélé une activité plus élevée comparée à celle de la ticarcilline seule ce qui explique l'action de l'acide clavulanique sur les B-lactamases de type pénicillinases chromoplasmiques ou plasmidiques des souches ciblées.

En ce qui concerne les aminosides; l'amikacine vient en premier rang avec un pourcentage de 64.15% des souches sensibles, par la suite viennent successivement la tobramycine avec 45.28% et la gentamycine avec 39.62%.

La sensibilité la plus marquée concernant les quinolones a été observée pour la ciprofloxacine avec un pourcentage de 60.37%, la sensibilité aux pefloxacine et fosfomycine montre une légère variabilité, dont le pourcentage des souches sensibles sont respectivement 35.84% et 37.73%.

2-5- Résultat de l'étude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle

2-5-1- Méthode de diffusion en disque

Les diamètres des zones d'inhibition des 53 souches de *P.aeruginosa* sous l'action de la solution mère de l'huile essentielle sont représentés dans le tableau 10.

Tableau 8: Diamètres des zones d'inhibition en (mm) de l'huile essentielle d'*Allium sativum*.

Souches testées	Diamètres d'inhibition (mm)
Souche 1	9.000 ± 0.000
Souche 2	9.333 ± 0.577
Souche 3	9.667 ± 1.528
Souche 4	8.000 ± 0.000
Souche 5	11.000 ± 0.000
Souche 6	9.667 ± 1.155
Souche 7	11.000 ± 0.000
Souche 8	11.000 ± 1.730
Souche 9	11.000 ± 1.000
Souche 10	11.333 ± 0.577
Souche 11	11.667 ± 0.577
Souche 12	9.000 ± 0.000
Souche 13	9.667 ± 0.577
Souche 14	9.333 ± 0.577
Souche 15	9.000 ± 1.000
Souche 16	9.333 ± 0.577
Souche 17	9.000 ± 0.000
Souche 18	9.667 ± 1.155
Souche 19	9.667 ± 1.528
Souche 20	9.000 ± 1.710
Souche 21	11.000 ± 0.000
Souche 22	11.333 ± 2.080
Souche 23	11.667 ± 1.155
Souche 24	11.000 ± 1.730

Souche 25	8.333 ± 0.577
Souche 26	8.667 ± 0.577
Souche 27	8.000 ± 1.000
Souche 28	8.333 ± 1.528
Souche 29	9.000 ± 1.710
Souche 30	9.333 ± 1.520
23 souches	Absence d'une zone d'inhibition

La figure 25 montre le pouvoir inhibiteur de l'huile essentielle vis-à-vis des souches testées de *P.aeruginosa*.

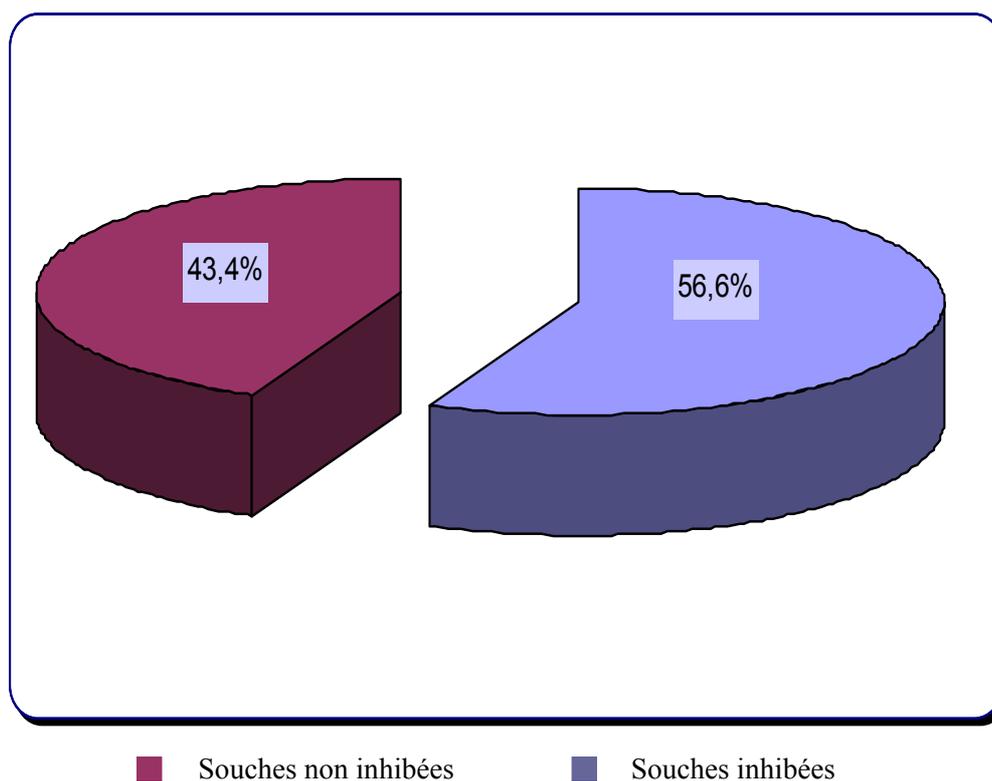


Figure 25: Pouvoir inhibiteur de l'huile essentielle d'*Allium sativum* vis-à-vis des 53 souches de *P.aeruginosa*.

D'après les résultats nous constatons que l'huile essentielle d'*Allium sativum* a montré une activité antibactérienne vis-à-vis seulement des 30 (56.6%) souches parmi les 53 souches testées de *P.aeruginosa* avec des diamètres d'inhibition faible entre 9mm et 11mm. Aucune zone d'inhibition n'a été enregistrée autour des disques pour 43.4% des souches testées.

La figure 26 montre la zone d'inhibition obtenue pour la souche testée N° 4.

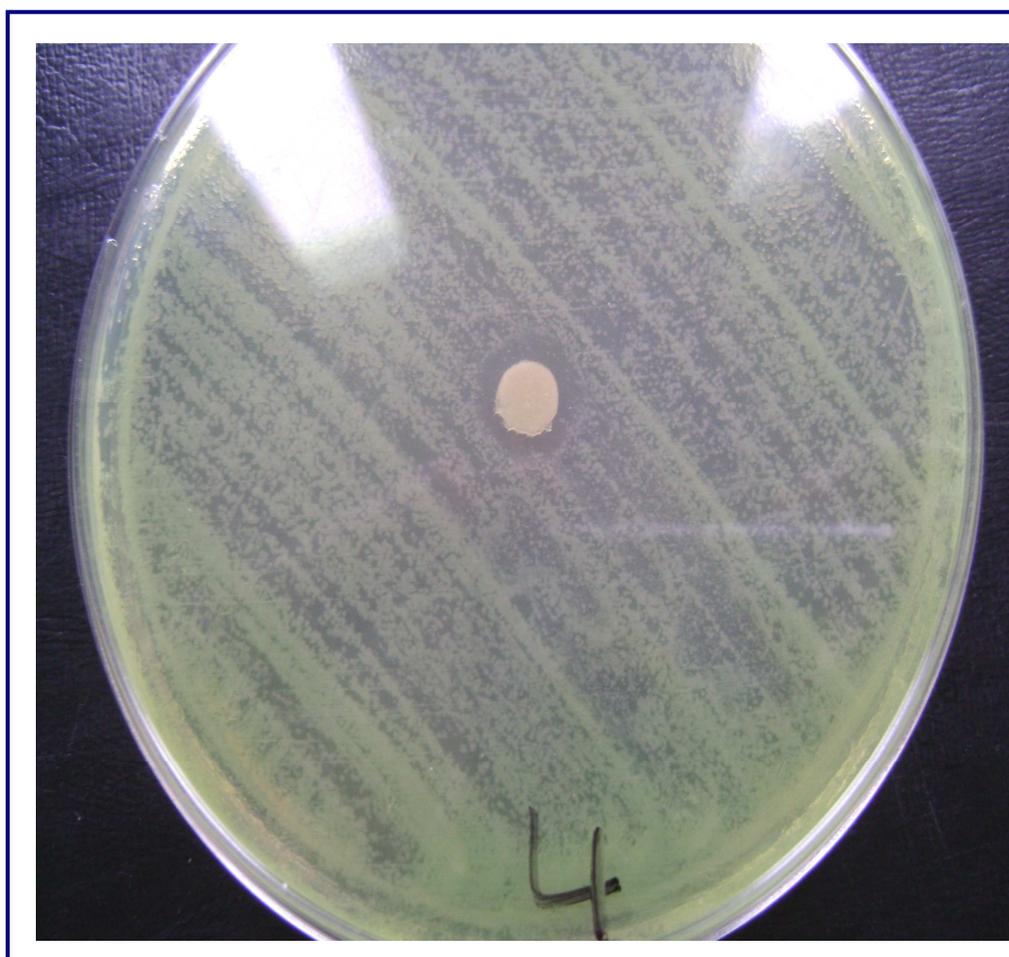


Figure 26: Zone d'inhibition de la souche testée N°4 montrant l'activité de l'huile essentielle d'*Allium sativum*

2-5-2- Détermination de la CMI par la méthode de dilution

Les résultats obtenus par la méthode de diffusion en disque nous ont conduit de faire confirmer quantitativement l'activité antibactérienne de l'huile essentielle vis-à-vis des 30 souches de *P.aeruginosa* qu'ont montré une zone d'inhibition. L'évaluation quantitative de l'activité antibactérienne de l'huile a été effectuée par la détermination de la CMI par les deux variantes de la méthode de dilution: méthode de dilution en milieu liquide et méthode de dilution en milieu solide.

Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 9 et la figure 27.

Tableau 9: Valeurs des CMI de l'huile essentielle obtenues par les deux variantes de la méthode de dilution (en µg/ml).

Souches testées	CMI en milieu liquide	CMI en milieu solide
Souche 1	64	128
Souche 2	64	128
Souche 3	64	128
Souche 4	64	64
Souche 5	32	64
Souche 6	32	64
Souche 7	64	128
Souche 8	32	64
Souche 9	64	128
Souche 10	64	128
Souche 11	64	128
Souche 12	32	64
Souche 13	32	64
Souche 14	64	128
Souche 15	64	128
Souche 16	64	128
Souche 17	64	128

Souche 18	64	128
Souche 19	32	64
Souche 20	64	128
Souche 21	64	64
Souche 22	64	64
Souche 23	64	128
Souche 24	64	128
Souche 25	64	128
Souche 26	32	64
Souche 27	64	128
Souche 28	64	128
Souche 29	64	128
Souche 30	64	128

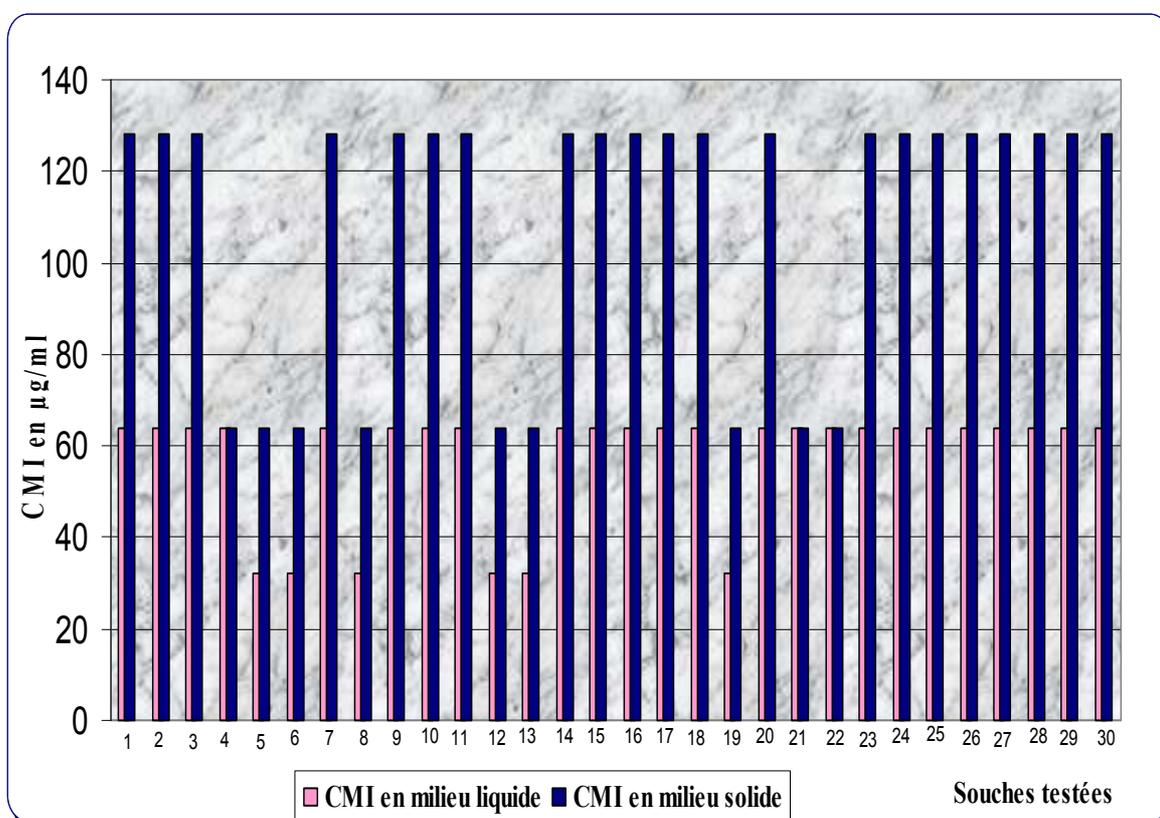


Figure 27: CMI obtenues par les deux variantes de la méthode de dilution

Nous remarquons que les résultats de l'étude de l'activité antibactérienne par les deux méthodes de dilution ont confirmé que l'huile essentielle d'*Allium sativum* témoigne d'une activité antibactérienne vis-à-vis des 30 souches testées de *P.aeruginosa* avec des CMI relativement moyenne entre 32µg/ml et 128µg/ml. Par ailleurs les résultats observés illustrent bien que les valeurs des CMI obtenues par la méthode de dilution en milieu solide (64µg/ml et 128µg/ml) sont élevées par rapport à celles obtenues par la méthode de dilution en milieu liquide (32µg/ml et 64µg/ml).

2-5-3- Détermination de la CMB

La comparaison des dénombrements bactériens effectuée après incubation a permis de déterminer un nombre supérieur à 10^2 cfu/ml dans toutes les boîtes ce qui correspond à un nombre supérieur à 0.01% du nombre initiale des bactéries ce qui signifie que cette huile possède une action bactériostatique et non bactéricide.

Discussion

Discussion

La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques dont la prescription à grande échelle et/ou parfois inappropriée de ces agents antibactériens peut entraîner la sélection de souches bactériennes multirésistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers les plantes médicinales qui constituent une source de nouvelles molécules à activité antibactérienne afin de limiter l'apparition de ce phénomène de multirésistance [77].

L'usage d'extraits de plantes contenant des constituants bio-actifs est devenu une approche très importante dans la médecine préventive, parmi ces extraits naturels les huiles essentielles commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bio-actives notamment dans le traitement des maladies infectieuses [23].

Au cours des dernières décennies, les chercheurs ont publié plus de 2 000 travaux scientifiques [81] portant sur le potentiel thérapeutique de l'ail (*Allium sativum*) qui est l'une des plantes les plus répondues dans la médecine traditionnelle et la plus largement citée dans la littérature pour ses propriétés médicinales. L'huile essentielle d'*Allium sativum* constitue l'extrait le plus connu principalement par son pouvoir antibactérien qui est attribué notamment aux composés sulfides qui les contient [30].

C'est dans le souci de valoriser la plante aromatique *Allium sativum* dans notre pays que nous avons jugé important d'étudier dans le cadre de ce travail la composition chimique de l'huile essentielle de cette plante et son pouvoir antibactérien vis-à-vis de différentes souches de *P.aeruginosa*; une bactérie qui cause souvent des problèmes vue sa résistance intrinsèque à plusieurs agents antibactériens et sa grande capacité à acquérir de la résistance au cours de l'antibiothérapie.

Dans notre travail, l'huile essentielle utilisée a été extraite à partir des bulbes de la plante *Allium sativum* par la méthode d'hydrodistillation, cette dernière nous a permis de récupérer un rendement en huile essentielle de 0.09%, elle est très faible en comparaison d'une part, avec celui obtenu par **Benkeblia N** qui a travaillé sur la même espèce de la région de Mostaganem dont il a trouvé un rendement qui est de 0.2% et avec celui obtenu par **Hacisferogullari H et al en 2005** qui est de 0.14% , cette équipe a porté également sur la plante d'*Allium sativum* originaire de Turquie et d'autre part, avec d'autre plantes des différents genres beaucoup cités dans la littérature [44] pour leur exploitation industrielle comme source des huiles essentielles comme: anise (1-3%), lavande (0.8- 2.8%), menthe poivrée (0.5-1%), rose (0.1-0.35%). Le faible rendement obtenu dans ce travail peut être expliqué par l'influence de la région d'origine et la nature de la plante sur la sécrétion de l'huile essentielles ou encore il est du au protocole d'extraction qui a été suivi au cours de notre étude où une bonne quantité de l'huile a été perdue lors de son séchage (a été absorbée par le filtre).

Dans un but de bien caractériser l'huile essentielle obtenue, une mesure de la densité relative ainsi qu'une analyse de la composition chimique ont été effectuées. La mesure de la densité a révélé que cette huile essentielle présente une densité relative qui est de 1.028, elle est supérieure à celle de l'eau ce qui explique son déplacement au dessous de l'eau lors de l'hydrodistillation, cette valeur de la densité est similaire à celle trouvé par **Ross Z.M. et al en 2001** (1.037) hors, l'analyse chimique effectuée par CPG/SM a révélé que huile essentielle utilisée dans cette étude se caractérise par la présence de deux composés majoritaires qui sont : l'allyl méthyl trisulfide: 34.61% et le diallyl disulfide: 31.65%, accompagnés d'autre constituants à des teneurs relativement faibles, cette huile essentielle est sensiblement analogue par sa composition chimique à celle trouvé par **O'gara E.A et al (2000)** pour une plante de la même espèce originaire de l'Inde dont l'huile essentielle est constituée majoritairement par le diallyl disulfide (53.00%) et le diallyl trisulfide (11.5%) alors que le profil trouvé par **Pyun M-S et Shin S (2006)** avec une plante originaire de Corée est cependant nettement différent avec certains composés qui ne sont pas détectés dans notre étude tel que: N,N-Diméthyl thiourea (1.46%), 3-Vinyl-4H-1,2-dithiin (1.99%), 3,3-Thio bis-1-propene (0.87%).

La différence de la composition constatée sur les huiles essentielles investiguées est vraisemblablement à mettre en rapport avec des facteurs abiotique tel que le climat spécifique aux régions de provenance des échantillons, les facteurs géographiques comme l'altitude et la nature du sol. A la meilleur reconnaissance des auteurs, le diallyl disulfide constitué souvent le composant dominant de l'huile essentielle d'*Allium sativum* par contre l'allyl méthyl trisulfide n'a jamais été rapporté comme constituant majoritaire de cette plante et de se fait, nous pouvons dire que la plante d'*Allium sativum* provenant d'El Harrouche représente selon toute vraisemblance un nouveau chémotype typique de l'est algérien.

L'évaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Allium sativum* par la méthode de diffusion en disque vis-à-vis différentes souches de *P.aeruginosa* a révélé que l'huile s'est avéré active sur plus de 50% des souches testées avec des zones d'inhibition très faibles. Des études qui ont été réalisées par **Ross Z.M et al en 2001** sur l'activité de l'huile essentielle d'*Allium sativum* de la région de l'Inde vis-à-vis des bactéries entériques humain par la méthode de diffusion ont montré que l'inhibition des bactéries a été limitée seulement que pour celles qui ont été juste autour de disque ceci a été traduit par des zones d'inhibition immesurables résultant de l'activité de la vapeur de l'huile essentielle non plutôt de l'huile elle même, ceci a été expliqué par l'absence d'une diffusion de l'huile dans la gélose à cause de sa nature hydrophobe et l'absence d'un émulsifiant qui va favoriser au moins un peu la diffusion de l'huile comme nous avons fait dans notre travail c'est pour cela que nous avons eu de différence avec leur résultat.

D'après les résultats de ces travaux nous pouvons dire que la zone d'inhibition d'une huile essentielle peut être affectée par sa volatilisation, sa solubilité et par son degré de diffusion dans la gélose. Ceci peut donc expliquer les faibles zones d'inhibition révélées dans nos résultats.

D'autre part, **Bouhdid S et al (2006)** ont testé l'activité de l'huile essentielle de trois plantes médicinales : *Thymus satureioides*, *Thymus Vulgaris* et *Corydothymus capitatus* par la méthode de diffusion sur une variété d'espèces bactériennes les plus fréquemment rencontrées en milieu hospitalier comme: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus*

aureus, les résultats obtenus ont montré que parmi toutes les espèces testées seulement les souche de *P.aeruginosa* n'ont pas montré une zone d'inhibition vis-à-vis de ces trois huiles essentielles investiguées , ceci a été également démontré par **Nair R et al en 2008** qui ont testé l'activité de l'huile essentielle de la plante médicinale : *Eucalyptus citriodora* HK sur: *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris* et *Bacillus cereus*, par ailleurs, l'évaluation du pouvoir antibactérien de l'huile essentielle de la plante médicinale: *Puticaria odora* réalisée par **E.L.Hanbali F et al (2005)** sur certaines espèces bactériennes comme: *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae* a montré que *P.aeruginosa* est la bactérie qui a révélé la plus faible zone d'inhibition.

D'après les travaux de ces chercheurs nous pouvons déduire que la zone d'inhibition d'une huile essentielle dépend de l'espèce bactérienne testée. *P.aeruginosa* est l'espèce la plus connue par sa résistance a la plupart des huiles essentielles, cette résistance est en relation avec la nature de sa membrane externe qui lui confère la résistance à la plupart des agents biocides.

L'absence des zones d'inhibition vis-à-vis des autres souches de *P.aeruginosa* peut être expliquée par la présence d'une pseudo capsule hydrophile qui empêche l'huile essentielle d'arriver à la bactérie testée. Ces pseudo capsules sont rencontrés souvent chez les souches de *P.aeruginosa* responsables d'infection chronique, c'est un moyen de protection chez elles.

Bien que la méthode de diffusion soit simple, rapide et applicable à tout type de substance antimicrobienne et tout micro-organisme, elle porte toujours des difficultés notamment dans l'interprétation des résultats des huiles essentielle vu que dans ce cas les zones d'inhibition doivent être affectées par plusieurs facteurs tels que : la mauvaise diffusion des huiles essentielles dans la gélose à cause de leur nature hydrophobe, leur volatilisation et la capacité limité des disque à absorber un volume suffisant de l'extrait à examiner de ce fait, cette méthode à été limité au criblage des activités antibactériennes qui doit être complété ensuite par une mesure de la sensibilité des micro-organismes à l'augmentation de la dose de l'extrait naturelle et la détermination de la CMI.

Dans la présente étude la détermination de la CMI de l'huile essentielle vis-à-vis des 30 souches de *P.aeruginosa* qui ont montré une zone d'inhibition par la méthode de dilution en milieu liquide a donné des CMI variant entre: 32µg/ml et 64µg/ml alors que celle de la dilution en milieu solide a révélé des valeurs situent entre 64µg/ml et 128µg/ml, ces valeurs semblent être tout à fait en accord avec celles obtenues par **Tsao S-M et Yin M-C** en **2001** qui ont testé l'activité antibactérienne de huile essentielle d'*Allium sativum* originaire de la chine sur une variété des souches de *P.aeruginosa* par la méthode de microdilution en milieu liquide, leurs résultats ont donné des CMI variant entre 16µg/ml et 64µg/ml par contre **O'gara E.A. et al (2000)** qui ont testé l'activité antibactérienne de la même huile essentielle d'une plante originaire de l'Inde vis-à-vis de *Helicobacter pylori* ont révélé des CMI entre 8µg/ml et 32µg/ml, elles sont plus faibles que celles obtenues dans nos résultats, dans ce cas la faible activité de l'huile essentielle utilisée dans notre étude peut être expliquée d'une part par son profil chimique pauvre en diallyl trisulfide (DATS) et diallyl tétrasulfide(DATTS) avec des concentrations respectives de 1.47% et 4.92% faiblement inférieurs à celle de la chine qui a représenté une forte activité antibactérienne (11.5% de DATS et de 53% DATTS), ces deux composants sont démontrés par plusieurs auteurs [93,118] comme les composants les plus actifs de l'huile essentielle d'*Allium sativum* et d'autre par cette variabilité de la CMI est due à la différence de la sensibilité de l'espèce bactérienne testée.

La valeur de la CMI peut être influencée également par la quantité de l'émulsifiant utilisé cependant, l'ajout d'un émulsifiant au cours de l'étude de l'activité antibactérienne peut limiter le contact entre l'huile essentielle et la bactérie à tester. Cette constatation a été remarquée lors de l'utilisation d'une quantité élevée de l'émulsifiant. De même la CMI peut être affectée par la méthode de sensibilisation employée vue que les valeurs de la CMI obtenues par la méthode de dilution en milieu liquide sont plus faibles que celles obtenues en milieu solide, cette même constatation a été rapportée par **Hammer K.A. et al (1999)** lors de l'étude du pouvoir antibactérien des huiles essentielles de 20 plantes médicinales. Cette différence hautement significative des CMI entre les deux méthodes de dilution peut être expliquée par l'influence de certains facteurs qui varient selon l'environnement du test. Ceux-ci comprennent : la différence de l'exposition des bactéries à l'huile essentielle, la différence de la

solubilisation de l'huile essentielle et notamment de ses composants actifs et de sa vaporisation.

Selon ces résultats obtenus il nous a parait évident que la méthode de dilution en milieu liquide est la méthode adéquate pour l'évaluation de l'activité antibactérienne d'une huile essentielle vue que la volatilisation de l'huile est minimisée un peu en présence d'un milieu liquide ainsi que son amélioration par l'ajout de l'agar qui augmente la durée de stabilité du mélange (huile essentielle + milieu de culture) contrairement a la méthode de dilution en milieu solide où nous avons eu une sur- évaluation de l'activité à cause de la volatilisation élevée de l'huile essentielle .

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

L'aromathérapie est une forme de médecine douce dont les effets thérapeutiques sont attribués aux composés aromatiques des huiles essentielles et des extraits de plantes. Elle connaît un engouement croissant en Europe et commence à être connue également en Afrique à des fins médicinales. Dans ce travail, l'étude de certains paramètres chimiques ainsi que de l'activité antibactérienne vis-à-vis différentes souches de *P.aeruginosa* de l'huile essentielle d'une plante aromatique très connue en aromathérapie : *Allium sativum* nous a permis de conclure que:

La plante d'*Allium sativum* récoltée de la région d'El Harrouche a présenté un rendement inentable en huile essentielle, ce dernier s'est caractérisée par une densité relative supérieure à celle de l'eau ainsi que par une composition chimique analysée à l'aide de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM) constituée presque de 100% des composés sulfides dont l'allyl méthyle trisulfide (34.61 %) et le diallyl disulfide (31.65%) représentent les composés majoritaires. L'allyl méthyle trisulfide n'a jamais été rapporté comme composant majoritaire de l'huile essentielle en question, de se fait, nous avons considéré que la plante d'*Allium sativum* provenant d'El Harrouche présente probablement un nouveau chémotype de l'est algérien: le chémotype allyl méthyle trisulfide/diallyl disulfide.

Le criblage préliminaire de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Allium sativum* vis-à-vis différentes souches de *P.aeruginosa* complété par la détermination de la CMI ont montré que l'huile possède une action inhibitrice de la croissance sur plus de 50% des souches testées avec des CMI relativement moyennes varient d'une méthode à une autre dont la méthode de dilution en milieu liquide a donné des CMI entre 32 et 64 μ g/ml alors que celles de la méthode de dilution en milieu solide sont situées entre 64 et 128 μ g/ml. La différences des valeurs de la CMI entre ces deux méthodes appliquées dans notre travail est due principalement à la différence de la volatilisation et la solubilité de l'huile essentielle étudiée ainsi que la différence de son contact avec la bactérie testée entre les différents environnements de ces deux méthodes.

A la suite de ces résultats, il serait donc très intéressant de continuer ce travail sur plusieurs aspects

- ❖ **M**ener une enquête détaillée sur les fractions de l'huile essentielle démontrant l'activité antibactérienne in vitro en vue d'identifier l'espèce chimique ou les composés responsables de cette activité ainsi que la synergie d'action probable entre eux, ces études devront être confirmés par un suivi in vivo.
- ❖ **E**nvisager l'étude de l'effet de cette (ces) substance (s) active (s) sur une éventuelle modification du génome bactérien.
- ❖ **S**achant que le but ultime de ce travail est la valorisation de la plante *Allium sativum* et la recherche de son intervention dans la phytothérapie humaine, l'évaluation de l'existence d'une éventuelle potentialité génotoxique dans l'huile essentielle issue de cette plante serait nécessaire.

Annexes

1-Milieus de culture utilisés

1-1-milieus de cultures solides

1-1-1– Gélose nutritive

1-1-2-1-Composition

- Extrait de viande de bœuf.....5 à 10g
- Peptone.....10g
- Chlorure de sodium.....5g
- Agar.....15g
- Eau distillée.....1000 ml

1-1-2-2-Préparation

Après dissolution de tous les ingrédients dans l'eau distillée, ajuster le pH à 7,4 et stériliser à 120°C pendant 20 min.

1-1-2-Milieu King A

1-1-2-1-Composition

- Agar.....12g
- Peptone bactériologique « A »..... 20g.
- Glycérol.....10g
- K₂H₂SO₄.....10g
- Mg Cl₂.....1,4g
- Eau distillée.....1000ml.

1-1-2-2-Préparation

Après dissolution de tous les ingrédients dans l'eau distillée, ajuster le pH à 7,2 et stériliser à 120°C pendant 20mn.

1-1-3– Milieu King B

1-1-3-1-Composition

- Agar.....12g.
- Peptone bactériologique « B ».....20g
- Glycérol.....10g
- K₂HPO₄ (anhydre)..... 1,5g
- Mg SO₄, 7 H₂O..... 1,5g

- Eau distillée..... 1000ml

1-1-3-2-Préparation

Après dissolution de tous les ingrédients dans l'eau distillée, ajuster le pH à 7,2 et stériliser à 120°C pendant 20 min.

1-1-4- Gélose au cétrimide

1-1-4-1-Composition

- Peptone.....20g
- Sulfate de potassium.....10g
- Chlorure de magnésium.....3g
- Cétrimide.....0,2g
- K₂HPO₄.....0,3g
- Acide malidixique.....0,015g
- Agar.....13g
- Glycérol.....10ml
- Eau distillée.....1000ml

1-1-4-2-Préparation

Après dissolution de tous les ingrédients dans l'eau distillée stérile chaudes, ajuster le pH à 7,1 et stériliser à l'autoclave 15 min à 120°C

1-1-5-Mueller Hinton

1-1-5-1-composition

- Infusion de viande de bœuf..... 4g
- Hydrolysate acide de caséine.....17,5g
- Amidon de Mais.....1,5g
- Agar.....12g

1-1-5-2-Préparation

Après dissolution de tous les ingrédients dans l'eau distillée, ajuster le pH à 7,3 et stériliser à l'autoclave 15 min à 121°C.

1-2-milieux de culture liquides

1-2-1– Bouillon nutritif

1-2-1-1-Composition

- Peptone..... 10g
- Chlorure de Sodium..... 5g
- Extrait de bœuf..... 5 à 10g
- Eau distillée..... 100ml

1-2-1-2-Préparation

Ajuster le pH à 7,3 et stériliser à 120°C pendant 20 min

1-2-2-Eau physiologique

1-2-2-1-Composition

- Chlorure de sodium..... 9g
- Eau distillée 1000ml

1-2-2-2-Préparation

Après dissolution de Chlorure de sodium dans l'eau distillée, ajuster le pH à 7 et stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 30mn.

2-Réactifs utilisés

2-1-Réactifs Kovacs

- Diméthyl amino 4- benzaldéhyde..... 50g
- Pentanol 750ml
- Acide chlorhydrique concentré..... 250ml

2-2-Solution du lugol

- Iode..... 10g
- Iodure de potassium..... 20g
- Eau distillée 1000ml

2-3-Solution de violet de gentiane

- Ethanol..... 2g
- Oxalate d'ammonium..... 0,8g
- Eau distillée..... 80ml.

2-4-Réactifs de Voges Proskauer (VP)

2-4-1-VP I

-hydroxyde de potassium.....	40g
-eau distillée.....	100ml

2-4-2-VP II

- Alpha-naphtol.....	6g
- Ethanol.....	100ml

Références Bibliographiques

- 1- **AFNOR.** (1992). Recueil des normes françaises sur les huiles essentielles. Paris.
- 2- **AHRQ.** Garlic. (2000). effects on cardiovascular risks and disease, protective effects against cancer, and clinical adverse effects. *Evid Rep Technol Assess* ;20 : 1-4.
- 3- **Amagase H.** (2006). Clarifying the real bioactive constituents of garlic. *J Nutr*; 136(3 Suppl):716S-25S.
- 4- **Amagase H., Petesch B., Matsuura H.** (2001). Intake of garlic and its bioactive components. *J Nutr*; 131(3): 955S-962S.
- 5- **Amhis W., Benslimane A., Tiouit D., Naim M.** (2001). Tests de sensibilité utiles au traitement antibiotique. *Médecine du Maghreb*; n°91.
- 6- **Andrews J.M.** (2001). The development of the BSAC standardization method of disc diffusion testing. *JAC. Ed: British society for antimicrobial chemotherapy.* (48) S1₂₉₋₄₂.
- 7- **Anton R., Bernard M.** (2003). Plantes thérapeutiques. Tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. 2^e édition. P19-22.
- 8- **Asma M., Al-Jasser.** (2004). Antimicrobial susceptibility pattern of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*.
- 9- **Auajjar N., Attarass B., Elhaloui N. E., Badoc A.** (2006). Multirésistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens* et *Staphylococcus aureus* et survie sur divers tissus hospitaliers. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*; 145: 61-76.
- 10- **Avato P., Tursi F., Vitali C., Micclis V., Candido V.** (2000). Allyl sulfide constituents of garlic volatile oil as antimicrobial agents. *Phytomedicine*; 7(3): 239-243.
- 11- **Avril J.L., Dabernat H., Denis F., Monteil H.** (1992). Bactériologie clinique. 2^{ème} édition. P265-271.

- 12- Avril J.L., Dabernat H., Denis F., Monteil H.** (2000). Bactériologie clinique. 3ème édition. P298-302.
- 13- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M.** (2008). Biological effects of essential oils. Review: *Food and Chemical Toxicology*; 46: 446–475.
- 14- Barclay N G., Spurrell J C., Bruno T F., Storey D G., Cardinal P.** (2003). Lignes directrices pour l'interprétation des résultats analytiques en microbiologie alimentaire.
- 15- Baudoux D.** (2000). L'aromathérapie: se soigner par les huiles essentielles. Edition Atlantica.
- 16- Béliveau R., Gingras D.** (2005). Les aliments contre le cancer. La prévention et le traitement du cancer par l'alimentation. Ed. Du Trécarré, Canada.
- 17- Benkeblia N.** (2004). Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*; 37:263-268.
- 18- Biljana B., Neda M.D., Isidora S., Anackov G., Ruzica I.** (2008). Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae). *Food Chemistry*; 111: 925-929.
- 19- Billerbeck V.G.** (2003). Détermination des CMI et QMI des produits air pharma sur des souches bactériennes multi résistantes. Laboratoire de Bactériologie, Virologie et Microbiologie industrielle. Toulouse.
- 20- Bloch AS.** (2000). Pushing the envelope of nutrition support: complementary therapies. *Nutrition*; 16(3):236-9.
- 21- Bloch K., Chaykin S., Phillips A.H., Ward A.** (1959). Mevalonic acid pyrophosphate and isopentenyle-pyrophosphate. *J. Biol. Chem*; 234: 2595-2604.

- 22- Bouchonnet S., Hoppilliard Y., Kargar-Grisel T.** (1999). Les différents types de spectromètres de masse utilisés pour l'analyse des composés organiques et bio-organiques, *Spectra Analyse*; 207: 11-25.
- 23- Bouhdid S., Idaomar M., Zhiri A., Baudoux D., Skali N.S., Abrini J.** (2006). *Thymus* essential oil: Chemical composition and in vitro antioxidant and antibacterial activities. Congrès International de Biochimie: Biochimie, Substances Naturelles et Environnement.
- 24- Bourgeois C.M., Mescle J.F.** (1996). Microbiologie alimentaire : aspect microbiologique de la sécurité et la qualité des aliments. p420.
- 25- Boyd B., Ford C., Koepke Michael C., Gary K., Horn E., McAnalley S., McAnalley B.** (2003). Etude pilotée ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose AOTM sur des personnes en bonne santé. *Glycoscience and Nutrition*; 4(6): P7.
- 26- Brada M., Bezzina M., Marlier M., Carlier A., Lognay G.** (2007). Variabilité de la composition chimique des huiles essentielles de *Mentha rotundifolia* du Nord de l'Algérie. *Biotechnol. Agron. Soc. Enviro*; 11 (1): 3–7.
- 27- Brossard H., Leyral G., Terry O.** (1997) .Activités techniques en microbiologie -2-; Bactériologie systématique. P119-123.
- 28- Bruneton J.** (1999). Pharmacognosie, Phytochimie – Plantes médicinales – Techniques et documentations, 3^{ème} Edition, Lavoisier.
- 29- Burt S.** (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential application in Foods. A review intern. *J of Food Microbiology*; 94: 223-253.
- 30- Camille D.** (1998). Microbiologie, 90 heures de travaux pratique, enseignement.
- 31- Camille D., Bernard T.** (2003). Surveillance sanitaire et microbiologique des eaux, Réglementation - Prélèvement - Analyse.

- 32- Caree P.** (1953). Précis de technologie et de chimie industrielle. T3. Ed. Ballière JB. et fils.
- 33- Carret G., Cavallo J D.** (2004). Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie.
- 34- Chamot E., Boffi El amari E., Rohner P., Van Delden C.** (2003). Effectiveness of combination antimicrobial therapy for *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother*; 47 (9) : 2756-64.
- 35- Chapuis J-P.** (1997). Connaître et utiliser favorablement les huiles essentielles.
- 36- Chevalier P.** (2005). Infections à *P.aeruginosa*.
- 37- Clément J-M.** (1981). Larousse Agricole. P 39.
- 38- Corzo-Martinez M., Corzo N., Villamiel M.** (2007). Biological properties of onions and garlic. *Food Science & Technology*; 18: 609-625.
- 39- Cowan M.M.** (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Review*; 12(4): 564-582.
- 40- Dauwalder O.** (2004). Fiche technique Santé -Sécurité- Matières Infectieuses; Section 1 – Agent Infectieux ; *Pseumonas* spp.
- 41- Doudoroff M., Palleroni N.** (1974). Bergey's Manual of determinative Bacteriology. eighth edition. P 217-243.
- 42- Dubey V.S., Bhalla R., Luthra R.** (2003). An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. *J.Biosci*; 28(5): 637-646.
- 43- Edeltraut K.** (2002). L'ail: plus qu'un simple aliment ? *Québec pharmacie*; vol, 49, n10: 864-868.

- 44- Edward P.C., Varro E.T., Lynn R. B.** (1987) Pharmacognosy, sixth edition. LEA et Febiger (ed): P184-187.
- 45- El Ajjouri M., Satrani B., Ghanmi M., Aafi A., Farah A., Rahouti M., Amarti F., Aberchane M.** (2008). Activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus bleicherianus* Pomel et *Thymus capitatus* (L.) Hoffm. & Link contre les champignons de pourriture du bois d'œuvre. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*; 12(4), 345-351.
- 46- El hanbali F., Akssira M., Ezoubeiri A., Gadhi C.E., Mellouki F., Benhrraf A., Blazquez A.M., Boira H.** (2005). Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Pulicaria odora* L. *Journal f Ethnopharmacology*; **99**: 399-401.
- 47- Euzeby J P.** (2005). Dictionnaire de bactériologie vétérinaire.
- 48- Eyohn J., Gorvan M.C.** (2006). Résistance in monfermenting Gram negative bacteria Multidrug resistance to the maximum. Association for professionals in infections control and epidemiology. Ed: Elsevier, France. (48) S₂₉-S₃₁.
- 49- Fasqueller.** (1974).Elément de bactériologie médicale.9^{ème} édition ., p386.
- 50- Fernandez M.** (2003). De Quelques plantes dites médicinales et de leurs fonctions, Editions Aenigma. P9.
- 51- Fernandez X., Kerverdo S., Dunach E., Curelier L.** (2002). Les hétérocycles dans la chimie des atomes. L'actualité chimique.
- 52- Figarella J., Leyral G.** (2004). Microbiologie général et appliquée. Edition Lanore.
- 53- Flandrois J.P.** (1997). Bactériologie médicale. P206-209.
- 54- Fraillery D.** (2001). La mise au point d'un modèle de pneumonie à *Pseudomonas aeruginosa* chez la souris et utilisation à des fins d'immunoprévention passive.

- 55- François X.G.** (2002). Le matériel végétal et les huiles essentielles. LASEVE-UQAC.P5-6.
- 56- Ganiere J.P., Mangion C., Peridy M.**(2004). Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices et Bactéricides de la cefquinome, la marbofloxacin, la tylosine et la spiramycine en solution dans du lait vis-à-vis de bactéries isolées de mammites bovines. *Revue Médecine vétérinaire*.155 (8): 411-416.
- 57- Gardner CD., Messina M.** (2003). Soy, garlic, and ginkgo biloba: their potential role in cardiovascular disease prevention and treatment. *Curr Atheroscler Rep*; 5(6):468-75.
- 58- Giamarellou H.** (2001). Antipseudomonadal antibiotics.
- 59- Giles K., Denis H.** (2000). An antibacterial assay of aqueous extract of garlic against anaerobic/microaerophilic and aerobic bacteria. *Microbial Ecology in Health and Disease*; 12: 81-84.
- 60- Gonen A., Harats D.** (2005). The antiatherogenic effect of allicin: possible mode of action. *Pathobiology*; 72(6):325-34.
- 61- Gorinstein S., Drzewiecki J.** (2005). Comparison of the bioactive compounds and antioxidant potentials of fresh and cooked Polish, Ukrainian, and Israeli garlic. *J Agric Food Chem*; 53(7):2726-32.
- 62- Guignard J-L., Henry M.** (1985). Abrégé de phytochimie. Masson; Paris New York Barcelone Mexico Sao Paulo. P 121-124
- 63- Guy L., Joffin J.N., Boineau F.** (1998). Microbiologie Technique. 2 Documentation technique 2^e édition. P 187-188.
- 64- Hacisferogullari H., Ozcan M., Demir F., Calisir S.** (2005).Some nutritional and Technological properties of garlic. *Journal of Food Engineering*; 68: 463-469.

- 65- Hajhashemi V., Ghannadi A., Sharif B.** (2003). Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia*. *J. Ethnopharmacol*; 89: 67–71.
- 66- Hammer K.A., Carson C.F., Riley T.V.** (1999). Antimicrobial activity of essential oil and other plant extracts. *Applied Microbiology*; 86: 985-990.
- 67- Hurtel J-M.** (2004). L'AIL: *Allium sativum*, Liliaceae. *Plantes et Médecine*.
- 68- Hurtel J-M.** (2006). Huiles essentielles et Médecine. *Aromathérapie et santé*.
- 69- Jakubowski H.** (2003). On the health benefits of *Allium* sp. *Nutrition*; 19(2):167-8.
- 70- Kal S., Achour W., Abdeladhim A., Bejaoui M., Ben Hassen A.** (2005). *Pseudomonas aeruginosa* isolées de patients immunodéprimés : résistance aux antibiotique sérotypage et typage moléculaire. *Médecine et maladies infectieuses*. (35) :530-535.
- 71- Kamagate A., Kone D., Coulibaly N.T., Brou E., Sixou M.** (2001). Etude comparative de différentes méthodes d'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries anaérobies strictes de la flore sous-gingivale. *Odonto-Stomatologie Tropicale*; N°95.
- 72- Karray H., Hammami A., Mahjoub F., Bouaziz M., Dammak T., et Jeddi H.M.,** (1993). Etude *in vitro* de la sensibilité aux antibiotiques de 213 souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées au service de réanimation du CHU de Sfax (Tunisie). *Pathologie et biologie*. Ed: Elsevier, France. 4: 307-312.
- 73- Koba K., Sanda K., Raynaud C., Nenonene Y.A., Millet J., Chaumont J.P.** (2005). Activités antibactériennes des huiles essentielles de trois *Cymbopogon Sp.* Africains vis-à-vis de germes pathogènes d'animaux de compagnie. *Ann.Méd.Vét*; 148: 202-206.
- 74- Lafont R.** (2002). Méthodes Physiques de Séparation et d'Analyse et Méthodes de Dosage des Biomolécules. *Biologie et Multimédia*.

- 75- Lamarti A., Badoc A., Deffieux J., Carde P.** (1994). Biogenèse des monoterpènes. II- La chaîne isoprénique. *Bull. Soc. Pharm.* Bordeaux; 133: 79 – 99.
- 76- Lansing M., John P., Harley.** (2003). Microbiologie 2^{ème} édition français, 5^{ème} édition américaine.
- 77- Larousse.** (2001). Encyclopédie des plantes médicinales : Identification, préparations, soins. P 28-31.
- 78- Lavendière F., Holstein A., Thiebaut L., Mallee R., Gravejat G., Desclozeaux B.** (1999). Les Principales Méthodes D'analyse. Dossier couplage. Centre Sciences des Processus Industriels et Naturels (SPIN). P51.
- 79- Leclerc H. (2003).** Y a-t-il des infections bactériennes opportunistes transmises par les eaux d'alimentation? *Journal Européen d'Hydrologie*, Tome 34, fasc.1 : P11-44.
- 80- Leelarungrayub N., Rattanapanone V.** (2006). Quantitative evaluation of the antioxidant properties of garlic and shallot preparations. *Nutrition*; 22(3):266-74.
- 81- Lefrançois P., Ruby F Dionne J-Y.** (2006). Ail. Société Canadienne de Recherche sur le PSN. P2-3
- 82- Lilia L., Méndez L., François C.** (2008).Effect of temperature cycling on allinase activity in garlic.*Food Chemistry*; 111: 56-60.
- 83- Liolios C.C., Gortzi O., Lalas S., Tsaknis J., Chinou I.** (2009). Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and in vitro antimicrobial activity. *Food Chemistry*; 112: 77-83.
- 84- Louis J., Loup J.** (2002). Bactériologie générale et médicale. P;,,,,.
- 85- Lynen F., Eggerer H., Henning U., Kessel I.** (1958). Farnesylpyrophosphat und 3-Methyl- Δ^3 -butenyl-1-pyrophosphat, die biologischen Vorstufen des Squalens. Zur Biosynthese der Terpene. III. - *Angew. Chem*;70, 738-742.

- 86- Mahmoud B.S.M., Yamasaki K., Miyashita K., Il-Shik S., Dong-suk C., Suzuki T.** (2004). Bacterial microflora of carp (*Cyprinus carpio*) and its Shelf-life extension by essential oil compounds. *Food Microbiology*; 21: 657-666.
- 87- Mann C.M., Markham J.L.** (1998). A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Applied Microbiology*; 84: 538-544.
- 88- Miesan K.H., Mohamed S.** (2001). Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. *J Agric Food Chem*; 49(6):3106-12.
- 89- Miron T., Wilchek M., Sharp A., Nakagawa Y., Naoi M., Nozawa Y., Akao Y.** (2008). Allicin inhibits cell growth and induces apoptosis through the mitochondrial pathway in HL60 and U937 cells. *Journal of Nutritional Biochemistry*; 19: 524–535.
- 90- Moulari B.** (2005). Propriétés antimicrobiennes in vitro d'extraits de deux plantes africaines – Rôle de l'Allicine – potentialisation du pouvoir antibactérien par nanoencapsulation. Thèse Doctorat Univ. Franche-Comté (France). P 209.
- 91- Nair R., Vaghasiya., Chanda S.** (2008). Antibacterial activity of *Eucalyptus citriodora* HK. Oil on few clinically important bacteria. *African journal of Biotechnology*; 7 (1): 025-026.
- 92- Najjaa H., Neffati M., Zouari S., Ammar E.** (2007). Essential oil composition and antibacterial activity of different extracts of *Allium roseum* L., a North African endemic species. *C.R.Chimie*; 10: 820-826.
- 93- O'Gara E. A., Hill D. J., Maslin D. J.** (2000). Activities of Garlic Oil, Garlic Powder, and Their Diallyl Constituents against *Helicobacter pylori*. *Applied and Environmental Microbiology*; Vol 66, No. 5: p. 2269–2273.
- 94- Padma S Vankar.** (2004). Essential Oils and Fragrances from Natural Sources. P31-34.

95- Paulette V., Josiane C. (2006). Ail; L'ail au fil du temps, Usages culinaires, Conservation, Jardinage biologique, Ecologie et environnement. P1-5.

96- Perry N.S., Bollen C., Perry E.K., Ballard C. (2003). Salvia for dementia Therapy. review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial. *Pharmacol. Biochem. Behav*; 75: 651–659.

97- Plesiat P. (2005). CHU besancen Pseudomonas; cours1, cours 2.

98 - Porter N. (2001). Essential oils and their production. *Corp AND Food Research*. N°39.

99- Pyun M.-S., Shin S. (2006). Antifungal effects of the volatile oils from Allium plants against *Trichophyton* species and synergism of the oils with ketoconazole. *Phytomedicine*; 13: 394– 400.

100- Rahal K., Belouni R., Aboun A., Bait S. (2005). Standardisation de l'antibiogramme en médecine vétérinaires à l'échelle nationale, république algérienne démocratique et populaire, ministère de l'agriculture, ministère de la santé, de la population et de la réforme hospitalière.

101- Rahal S. (2004). Chimie des produits naturels et des êtres vivants. Office des publications universitaire. P13.

102- Rai M.K., Acharya D., Wadegaonkar L. (2003). Plant derived- antimycoties: Potential of Asteraceous plants, in: plant-derived antimycoties. Current Trends and Future prospects, Haworth press, N-York, Londin, Oxford.165-185.

103- Ross ZM., O’Gara E.A., Hill D.J., Sleightholme H.V., Maslin D.J. (2001). Antimicrobial properties of garlic oil against human enteric bacteria: evaluation of methodologies and comparisons with garlic oil sulfides and garlic powder. *Applied and Environmental Microbiology*; 67(1):475-480.

- 104- Ruzicka L.** (1953). The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Experientia*; 9: 357-396.
- 105- Schaechter et Eisenstein.** (1999). Microbiologie et pathologie infectieuse. P284-286.
- 106- Semen E., Hizioglu S.** (2005). Production, Yield and Derivatives of Volatile Oils from Eastern Redcedar (*Juniperus Virginiana* L.) . *American Journal of Environmental Sciences*; 1 (2): 133-138.
- 107- Serge A., David M.** (1999). Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes and Infection*; 2: 125-129.
- 108- Sharma S., Sangwan N.S., Sangwan R.S.** (2003). Developmental process of essential oil glandular trichome collapsing in menthol mint. *Current science*; 84 (4-25): 544-558.
- 109- Shim ST., Kyung KH.** (1999). Natural microflora of prepeeled garlic and their resistance to garlic antimicrobial activity. *Food Microbiology*; 16: 165-172.
- 110- Silva J., Abebe W., Sousa S.M., Duarte V.G., Machado M.I.L., Matos F.J.A.** (2003). Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of Eucalyptus. *J.Ethnopharmacol*; 89: 277–283.
- 111- Smallfield B.** (.2003). Introduction to growing herbs for essential oils, medicinal and culinary purposes. *Corp and Food Research*. N°45. P4.
- 112- Sousa EMBD., Chiavone –Filho O., Moreno MT., Silva DN., Marques M.O.M., Meireles MAA.** (2002). Experimental Results for extraction of essential oil from *Lippia sidoides* cham. Using pressurised carbon dioxide. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* ; 19(02): 229-241.
- 113- Soussy C J.** (2004). Comité de l'antibiogramme de la société française de la microbiologie.

- 114- Stefanovits-Banyai E., Tulok M.H., Hegedus A., Renner C., Varga I.S.** (2003). Antioxydant effect of various rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) clones. *Acta Biologica Szegediensis*; 47 (1-4): 111-113.
- 115- Svoboda K.P., Hampson J.B.** (1999). Bioactivity of essential oils of selected temperature aromatic plants: antibacterial, antioxidant, antiinflammatory and other related pharmacological activities. Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK., KA65HW.
- 116- Tattelman E.** (2005). Health effects of garlic. *Am Fam Physician*; 72(1):103- 6.
- 117- Teixeira da Silva J.A.** (2004). Mning the essential oils of the Anthemideae. *African journal of Biotechnology*, 3 (12): 106-720.
- 118- Tsao S-M., Yin M-C.** (2001). In vitro activity of garlic oil and four diallyl sulphides against antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*; 47: 665-670.
- 119- Valnet.** (2003). Les huiles essentielles, une santé toute naturelle. Phytothérapie de la recherche à la pratique. Vol 1(1): P12.
- 120- Verdrager J.** (1978). Ces médicaments qui nous viennent des plantes, Ed. Maloine S.A. P12-15.
- 121- Verhoff J., and Schmitz F.J.** (2000). Antimicrobial resistance in European isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *European journal of clinical infectious diseases*.19:370-374.
- 122- Wallach O.** (1887). Zur Kenntnis der Terpene und  therischen Oele. *Justus Lieb. Ann. Chem*; 238, 78-89.
- 123- Wildman REC.** (2001). Handbook of nutraceuticals and functional foods. CRC Press Ed.

124- Willcox JK., Ash SL., Catignani GL. (2004). Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit Rev Food Sci Nutr*; 44(4):275-95.

125- WILLEM J.P. (2004). Les huiles essentielles, médecine d'avenir. P 318.

126- World Health Organization. Geneva. (1999). Who monographs on selected medicinal plants. Volume 1.

Web références:

127- <http://maps.google.fr>

Autres références:

128- Encyclopédie multilingue: Wikipédia

129- Fiche technique de l'API20NE.

Bibliographie

