



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

قسم : : **Département : Microbiologie**

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biotechnologie

Spécialité : Mycologie et Biotechnologie Fongique

Intitulé :

Étude comparative, *in vitro*, entre l'effet des antifongiques de synthèse et les huiles essentielles d'*Allium sativum* et *Zingiberis rhizoma* sur deux espèces d'intérêt médical: *C. albicans* et *A. niger*.

Présenté et soutenu par :

Le : 05/06/2018

KHEBBEB Leïla et BOUANAKA Hamza

Jury d'évaluation :

Président du jury : M^{me} BENKAHOUL Malika (M.C.B. - UFM Constantine 1).

Rapporteur : M^{me} MIHOUBI Ilhem (Professeur- UFM Constantine 1).

Examinatrice : M^{me} OULMI Lamia (M.C.B. - UFM Constantine 1).

***Année universitaire
2017 – 2018***

Remerciements

Nous adressons nos plus vifs remerciements :

Au Docteur BENKAHOUL Malika, qui nous a fait l'honneur de présider le jury de cette soutenance.

Au Docteur OULMI Lamia, qui a généreusement accepté d'examiner notre travail.

Notre profonde gratitude pour notre encadreur Professeur MIHOUBI Ilhem qui nous a fait l'honneur de diriger notre mémoire de master. Vous n'avez ménagé aucun effort malgré vos nombreuses responsabilités, merci pour vos orientations votre disponibilité et votre généreuse patience.

Nous tenons à remercier tout particulièrement Professeur KABOUCHE Zahia (Université des Frères Mentouri, Constantine 1), qui nous a permis de réaliser les extractions par SFME au sein de son Laboratoire d'Obtention des Substances Thérapeutiques, avec l'aide précieuse du Docteur MAADADI Ramzi, pour qui nous exprimons notre plus grande gratitude.

Au responsable des laboratoires monsieur SLOUGUI Saddek, qui nous a facilité l'accès aux différents laboratoires.

A messieurs GHENAI Nabil, BOUMALA Houcine et madame ZOGHMAR Samia pour leur aide précieuse.

Dédicaces

Pour ma douce maman Nabiha et à ma sœur Mimi :

Aucune dédicace aussi parfaite soit-elle, ne saurait exprimer toute ma reconnaissance et tout l'amour que je vous porte.

Ce travail représente le fruit de votre soutien, vos sacrifices et vos encouragements.

Pour mon père Ninou, mes frères Cherouf et Boubakeur. Sans oublier Amina.

Pour mes chers Doudja et tonton Zoubir :

Je vous dédie ce travail pour vous remercier pour votre grande confiance en moi.

Pour mes neveux & nièces : Atef, Lyna, Maya, Arwa, Maïssa, Maria et Lyes :

Puisse ce modeste travail être cité un jour dans vos recherches.

Pour mes amies :

Sabrina : ce travail n'aurais pas vu le jour sans ton soutien et ta compréhension illimités,

tu as contribué à réaliser un de mes rêves.

Anissa, Chahinez, Faouzia, Nawel et Sana mes chères amies de toujours.

Pour Professeur Mansouri mon directeur, ainsi que pour Farah et Diana mes collègues au LNCPP Alger :

Pour votre aide précieuse.

Leïla

DEDICACES

✿ *Je dédie ce mémoire à*

A la mémoire de mon père

Puisse ton âme reposer en paix. Que Dieu, le tout puissant, te couvre de Sa Sainte miséricorde et t'accueille dans son éternel paradis.

A ma très chère mère

Je ne trouve pas les mots pour traduire tout ce que je ressens envers une mère exceptionnelle dont j'ai la fierté d'être le fils.

Ta noblesse et ta bonté sont sans limites.

Que ce travail soit un hommage aux énormes sacrifices que tu t'es imposées afin d'assurer mon bien être, et que Dieu tout puissant, préserve ton sourire et t'assure une bonne santé et une longue vie afin que je puisse te combler de mon amour.

A ma chère épouse et ma fille Rana

Les mots ne sauraient exprimer l'entendue de l'affection que j'ai pour vous et ma gratitude.

Vous m'avez soutenu et comblé tout au long de mon parcours.

Que Allah vous bénisse et vous protège.

Je vous souhaite une vie pleine de bonheur, de santé et de prospérité.

Que ce travail soit témoignage de mes sentiments les plus sincères et les plus affectueux.

A mes très chères

Frères : Yassine, Abdelhakim, Fouad

Et sœurs : Siham, Khadidja, Radia

Vous savez que l'affection et l'amour fraternel que je vous porte sont sans limite.

J'implore Dieu qu'il vous apporte bonheur et vous aide à réaliser vos vœux.

Je vous souhaite une vie pleine de joie.

A mes amis et collègues

Saddek S, Mohamed C, Bilal B, Nabil G, Hocine B, Amar B, Nabil B, Yasser B, Ibrahim C.

Vous êtes pour moi plus que des amis! Je ne saurais trouver une expression témoignant de ma reconnaissance et des sentiments de fraternité que je vous porte. Je vous dédie ce travail en témoignage de notre amitié que j'espère durera toute la vie.

A tous ceux qui me sont chers et que j'ai omis de citer.

Hamza

RESUME

Les infections fongiques représentent actuellement un véritable problème de santé publique. Bien que les traitements soient disponibles, ils n'en demeurent pas moins qu'ils restent coûteux et souvent liés à l'émergence de souches résistantes à certains antimycosiques.

La recherche de nouvelles molécules actives est donc une nécessité. Pour contribuer à l'effort de recherche d'alternative thérapeutiques, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'activité antifongique, in vitro, de deux huiles essentielles provenant d'une plante liliacée, qui est l'ail et d'une autre tropicale, le gingembre, considérées comme étant des condiments à large consommation en Algérie. Les huiles essentielles d'*Allium sativum* et *Zingiberis rhizoma*, obtenues par hydrodistillation et par technique du Solvent Free Microwave extraction (SFME), ont été testées sur deux espèces fongiques responsables des mycoses humaines : *Candida albicans* et *Aspergillus niger*. Les résultats obtenus montrent une activité antifongique significative des extraits utilisés avec un effet plus marqué sur d'*Aspergillus niger*. En effet, cette activité s'est révélée meilleure que celle du fluconazole et de l'amphotéricine B.

Mot clés : Activité antifongique, Huile essentielle, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*,
Allium sativum, *Zingiberis rhizoma*

ABSTRACT

Fungal infections are, presently, a serious public health problem. Although treatments are available, they remain expensive and often linked to the emergence of strains that are resistant to some antimicrobials. The search for new active molecules is therefore necessary. To contribute to the therapeutic alternative research effort, the purpose of this research is to study the antifungal activity, *in vitro*, of two essential oils from a lily plant which is garlic and a tropical one, ginger. These condiments are considered to be large-scale consumption in Algeria. The essential oils of *Allium sativum* and *Zingiberis rhizoma*, obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction technique (SFME), have been tested against two fungal species responsible for human mycosis: *Candida albicans* and *Aspergillus niger*. The results obtained show a significant antifungal activity of the extracts used with a more marked effect on *Aspergillus niger*. This activity proved to be better than that of fluconazole and amphotericin B.

Key Words: Antifungal activity, Essential oil, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Allium sativum*, *Zingiberis rhizoma*

ملخص

تمثل الالتهابات الفطرية مشكلة صحية حقيقية تمس جميع فئات المجتمع. بالرغم من توفر العلاج ، إلا أنه يظل باهظ الثمن و هو مرتبط في كثير من الأحيان بظهور سلالات مقاومة لبعض المضادات الفطرية. ولذلك فإن البحث عن جزيئات نشطة جديدة أصبح أمراً ضرورياً. قمنا في هذه الدراسة بالمساهمة في البحث العلاجي البديل ، واهتمنا بدراسة النشاط المضاد للفطريات ، مخبرياً ، لزيتين أساسيين الأول من سلالة الزنبيق و هو الثوم وآخر استوائي ، الزنجبيل ، يعتبران من التوابل الأكثر استهلاكاً في الجزائر. الزيوت الأساسية المستخلصة من *Allium sativum* و *Zingiberis rhizoma*، التي تم الحصول عليها بطريق hydrodistillation وتقنية الاستخلاص بالموجات الدقيقة بدون استعمال المذيبات (SFME)، تم اختبارها ضد سلالتين فطريتين مسببة لأمراض فطرية للإنسان و هما : *Candida albicans* و *Aspergillus niger*. أظهرت النتائج المتحصل عليها نشاطاً مضاداً هاماً للمستخلصات، و بنتيجة هامة أكثر بالنسبة ل *Aspergillus niger*. في الواقع ، أظهر نشاط المستخلصين نتائج أفضل من نشاط الفلوكونازول والأمفوتيرييسين ب.

الكلمات المفتاحية : نشاط مضاد للفطريات , زيت أساسي, *Candida albicans, Aspergillus niger*,

Allium sativum, Zingiberis rhizoma.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Composition chimique des HE	4
Tableau 2 : Rendements en huiles essentielles extrait par hydrodistillation et SFME pour les plantes investiguées	37
Tableau 3 : Zones d'inhibition (mm) en présence de différentes concentrations d'HE d'ail extrait par hydrodistillation de l'espèce <i>C.albicans</i>	41
Tableau 4 : Zones d'inhibition (mm) en présence de différentes concentrations d'HE d'ail extrait par SFME de l'espèce <i>C.albicans</i>	42
Tableau 5 : Zones d'inhibition (mm) en présence de différentes concentrations d'HE de gingembre extrait par hydrodistillation de l'espèce <i>C.albicans</i>	43
Tableau 6 : Zones d'inhibition (mm) en présence de différentes concentrations d'HE de gingembre extrait par SFME de l'espèce <i>C.albicans</i>	44
Tableau 7 : Zones d'inhibition (mm) en présence de différentes concentrations de Fluconazole à 150mg sur la souche <i>C.albicans</i>	45
Tableau 8 : Zones d'inhibition (mm) en présence de différentes concentrations d'Amphotéricine B à 10% sur la souche <i>C.albicans</i>	46
Tableau 9 : Zones d'inhibition (mm) en présence de différentes concentrations d'HE d'ail extrait par hydrodistillation de l'espèce <i>A.niger</i>	48
Tableau 10 : Zones d'inhibition (mm) en présence de différentes concentrations d'HE d'ail extrait par SFME de l'espèce <i>A. niger</i>	49
Tableau 11 : Zones d'inhibition (mm) en présence de différentes concentrations d'HE de gingembre extrait par hydrodistillation de l'espèce <i>A. niger</i>	50
Tableau 12 : Zones d'inhibition (mm) en présence de différentes concentrations d'HE de gingembre extrait par SFME de l'espèce <i>A. niger</i>	51

Tableau 13 : Zones d'inhibition (mm) en présence de différentes concentrations de Fluconazole à 150mg sur <i>A. niger</i>	52
Tableau 14 : Zones d'inhibition (mm) en présence de différentes concentrations d'Amphotéricine B à 10% sur <i>A. niger</i>	53

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure chimique de l'isoterpène (2-méthylbuta-1,3-diène) et d'un monoterpène	5
Figure 2 : Structure chimique du géraniol et du cinnamaldéhyde	5
Figure 3 : Structure chimique des coumarines	6
Figure 4 : Extraction par hydrodistillation	11
Figure 5 : Principe d'extraction par CO ₂ supercritique	12
Figure 6 : Extraction aux ultrasons	12
Figure 7 : Différentes parties d'un appareil d'extraction assisté par micro-ondes	13
Figure 8 : Extraction sans solvant assisté par micro-ondes ou « Solvent Free Microwave Extraction (SFME) »	14
Figure 9 : Plante et fleur d'ail	16
Figure 10 : Plante et rhizome de gingembre	19
Figure 11 : Feuilles et fleurs de gingembre	19
Figure 12 : <i>Candida albicans</i> , Culture sur milieu Schaedler agar et aspect microscopique	23
Figure 13 : <i>Aspergillus niger</i> , Culture de 7 jours sur gélose au malt à 25°C et aspect microscopique	25
Figure 14 : Photographies des gousses d'ail et de rhizomes de gingembre utilisés dans notre étude.....	29
Figure 15 : Photographies prises lors de l'extraction de l'ail et gingembre par hydrodistillation au Laboratoire N°2, suivie d'une récupération liquide – liquide au Laboratoire de Biochimie (Faculté SNV, Université Frères Mentouri Constantine1).....	31
Figure 16 : Photographies prises lors de l'extraction de l'ail et gingembre par technique SFME au laboratoire LOST, Université Frères Mentouri Constantine 1.....	32

Figure 17 : Photographies prises lors de la réalisation des essais antifongique.	36
Figure 18 : Rendement en huile essentielle extrait par hydrodistillation et SFME pour les deux plantes investiguées	38
Figure 19 : Photographies d'une culture de 7 jours d' <i>A.niger</i> , sur gélose SAB-CMP	39
Figure 20 : Observation microscopique d' <i>A.niger</i> à l'objectif × 40	39
Figure 21 : Photographie d'une culture de 48 heures de <i>C. albicans</i> , sur gélose Sabouraud-CMP (identification macroscopique).....	40
Figure 22 : Observation microscopique de <i>C. albicans</i> à l'objectif × 40	40
Figure 23 : Résultats de l'activité antifongique des différentes concentrations de l'HE d'ail extraite par hydrodistillation sur <i>C.albicans</i>	41
Figure 24 : Résultats de l'activité antifongique des différentes concentrations de l'HE d'ail extraite par SFME sur <i>C.albicans</i>	42
Figure 25 : Résultats de l'activité antifongique des différentes concentrations de l'HE de gingembre par hydrodistillation sur <i>C.albicans</i>	43
Figure 26 : Résultats de l'activité antifongique des différentes concentrations de l'HE de gingembre par SFME sur <i>C.albicans</i>	44
Figure 27 : Résultats de l'activité antifongique des différentes concentrations du témoin positif Fluconazole à 150mg sur <i>C.albicans</i>	45
Figure 28 : Résultats de l'activité antifongique des différentes concentrations du témoin positif Amphotéricine B à 10% sur <i>C.albicans</i>	46
Figure 29 : Résultats de l'activité antifongique des témoins négatifs (DMSO et Méthanol) sur <i>C.albicans</i>	47
Figure 30 : Effets des différents testés sur <i>C.albicans</i>	47
Figure 31 : Résultats de l'activité antifongique des différentes concentrations de l'HE d'ail extrait par hydrodistillation sur <i>A. niger</i>	48

Figure 32 : Résultats de l'activité antifongique des différentes concentrations de l'HE d'ail extrait par SFME sur <i>A. niger</i>	49
Figure 33 : Résultats de l'activité antifongique des différentes concentrations de l'HE de gingembre extrait par hydrodistillation sur <i>A. niger</i>	50
Figure 34 : Résultats de l'activité antifongique des différentes concentrations de l'HE de gingembre extrait par SFME sur <i>A. niger</i>	51
Figure 35 : Résultats de l'activité antifongique des différentes concentrations du témoin positif Fluconazole à 150mg sur <i>A. niger</i>	52
Figure 36 : Résultats de l'activité antifongique des différentes concentrations du témoin positif Amphotéricine B à 10% sur <i>A. niger</i>	53
Figure 37 : Résultats de l'activité antifongique des témoins négatifs (DMSO et Méthanol).	54
Figure 38 : Effets des différents testés sur <i>A.niger</i>	54

LISTE DES ABREVIATIONS

AFNOR	: Association Française de normalisation
AI	: Absence d’Inhibition
ATCC	: American Type Culture Collection
BS	: Bouillon Sabouraud
CLSI	: Clinical and Laboratory Standard Institutes
CMF	: Concentration Minimale Fongicide
CMI	: Concentration Minimale Inhibitrice
DO	: Densité Optique
DMSO	: Diméthylsulfoxyde
FDA	: Food and Drug Administration
HE	: Huile Essentielle
HIV	: Human Immunodeficiency Virus
IPT	: Inhibition Presque Totale
ISO	: International Organization for Standardization
IT	: Inhibition Totale
LOST	: Laboratoire d’Obtention des Substances Thérapeutiques
MH	: Gélose Muller-Hinton
Mh	: Masse d’huiles essentielles
Mv	: Masse du matériel végétal
NA	: Non Appliqué
RHE	: Rendement en Huile Essentielle
SAB-CMP	: Gélose Sabouraud 6chloramphénicol
SFME	: Solvent Free Microwave Extraction
SIDA	: Syndrome d’Immunodéficience Acquise
SNV	: Science de la Nature et de la Vie
UFC	: Unité Formant Colonie
WHO	: World Health Organization

TABLE DES MATIERES

Liste des tableaux	i
Liste des figures.....	ii
Liste des abréviations.....	iii
INTRODUCTION.....	1

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : GENERALITES SUR LES HUILES ESSENTIELLES	3
I-1. Définition des l'huiles essentielles.....	3
I-2. Localisation des essentielles dans la plante	3
I-3. Composition des huiles essentielles	3
I-3.1. Les terpènes.....	5
I-3.2. Les aldéhydes aromatiques	5
I-3.3. Les coumarines	6
I-4. Critères de qualité des huiles essentielles	6
I-4.1. Origine géographique	7
I-4.2. Mode de culture	7
I-4.3. Le stade de développement botanique.....	8
I-4.4. Le chemotype.....	8
I-5. Activité antimicrobienne des huiles essentielles	8
I-5.1. Activité antifongique	9
I-5.2. Activité antibactérienne.....	9
I-5.3. Activité antivirale	9
I-5.4. Activité antiparasitaire.....	9
I-5.5. Activité antiseptique	10
I-6. Techniques d'extraction des huiles essentielles	10
I-6.1. Extraction par hydrodistillation	10
I-6.2. Extraction par solvants	11
I-6.3. Extraction au CO ₂ supercritique.....	11
I-6.4. Extraction aux ultrasons	12
I-6.5. Extraction sans solvant assisté par micro-ondes.....	13

CHAPITRE II : GENERALITES SUR LES PLANTES INVESTIGUEES.....	15
II-1. <i>Allium sativum</i>	15
II-1.1. Origine et répartition géographique	15
II-1.2. Classification dans la systématique botanique	15
II-1.3. Description morphologique	16
II-1.4. Propriétés thérapeutiques	16
II-2. <i>Zingiberis rhizoma</i>	17
II-2.1. Origine et répartition géographique	17
II-2.2. Classification dans la systématique botanique	18
II-2.3. Description morphologique	18
II-2.4. Propriétés thérapeutiques	19
CHAPITRE III : LES CHAMPIGNONS D'INTERET MEDICAL	20
III-1. Généralités.....	20
III-2. <i>Candida albicans</i>	21
III-2.1. Habitat et répartition géographique	21
III-2.2. Classification taxonomique	22
III-2.3. Morphologie	22
III-2.4. Pouvoir pathogène	23
III-3. <i>Aspergillus niger</i>	24
III-3.1. Habitat et répartition géographique	24
III-3.2. Classification taxonomique	24
III-3.3. Morphologie	25
III-3.4. Pouvoir pathogène.....	25
CHAPITRE IV : EVALUATION <i>IN VITRO</i> DE L'ACTIVITE ANTIFONGIQUE DES HUILES ESSENTIELLES	27
IV-1. Méthode de diffusion	27
IV-1.1. Méthode de diffusion par puits	27
IV-1.2. Méthode de diffusion par disques.....	27
IV-1.3. Méthode de dilutions	28
MATERIEL ET METHODES	
1. Matériel végétale.....	29
2. Souches fongiques	29
3. Techniques d'extraction des huiles essentielles.....	30
3.1. Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation.....	30

3.2. Extraction des huiles essentielles par extraction sans solvant assistée par micro-ondes	31
3.2.1. Détermination des rendements en huiles essentielles	32
4. Activité antifongique	33
4.1. Mise en évidence de la pureté des souches fongiques	33
4.2. Détermination de la concentration de l'inoculum par turbidimétrie.....	33
4.3. Préparations des témoins	34
4.4. Conditions opératoires	35
4.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par la méthode de diffusion sur gélose	36
4.6. Détermination de la concentration minimale fongicide (CMF).....	36

RESULTATS ET DISCUSSIONS

1. Calcul du rendement.....	37
2. Activité antifongique	38
2.1. Confirmation de la pureté des souches fongiques.....	38
2.2. Détermination de l'activité antifongique des HE.....	40
2.2.1. Effets sur <i>C. albicans</i>	40
2.2.2. Effets sur <i>A. niger</i>	48
DISCUSSION GENERALE.....	55
CONCLUSION & PERSPECTIVES.....	57
REFENCES BIBLIOGRAPHIQUES	59
ANNEXES	I

INTRODUCTION

Les infections fongiques représentent actuellement un véritable problème de santé publique et constituent l'une des principales causes de décès surtout chez les immunodéprimés à travers le monde (Dzoyem *et al.*, 2006). Bien qu'on dispose aujourd'hui de médicaments antifongiques, le traitement des mycoses reste difficile d'une part du fait du nombre limité de principes réellement efficaces et de leur coût très élevé et d'autre part lié à l'émergence de souches résistantes à certains antimycosiques usuels (Sheehan *et al.*, 1999).

La découverte de nouvelles molécules permettrait par défaut d'éliminer les facteurs pathogéniques, d'améliorer l'état de santé des malades. Le règne végétal, base de notre médecine traditionnelle est susceptible de fournir un grand nombre de molécules dotées de propriétés antifongiques (Young *et al.*, 2003).

De nos jours, la médecine moderne utilise les vertus thérapeutiques des huiles essentielles et de leurs constituants. Ainsi, de nombreux composés volatils sont les ingrédients courants des préparations pharmaceutiques. Le thymol, par exemple, est employé en soins dentaires pour ses propriétés antiseptiques ou encore l'eugénol pour ses propriétés analgésiques (Pauli, 2001 *cité dans* Belkhouja, 2016). Les huiles essentielles constituent donc une source intéressante de nouveaux composés dans la recherche de molécules.

L'objectif de la présente étude est de mettre en évidence l'activité antifongique *in-vitro* de deux produits de grande consommation en Algérie qui sont l'ail et le gingembre, sur deux souches fongiques de la collection ATCC : *Candida albicans* ATCC 10231, responsable de diverses candidoses (vaginale, muguet, intertrigo, etc...). Et *Aspergillus niger* ATCC 16404, responsable d'aspergilloses qui sont de graves mycoses invasives (otomycoses, pulmonaire, abcès cérébraux...), qui peuvent être mortelles pour certains sujets infectés. Cette activité sera comparée à celle de deux médicaments antifongiques classiques qui sont le fluconazole : $C_{13}H_{12}F_2N_6O$, un bi-triazolé reconnu comme antimycosique à usage systémique, il agit en inhibant la biosynthèse de l'ergostérol d'origine fongique (Roguet *et al.*, 2014). Le second médicament est l'amphotéricine B : $C_{47}H_{73}NO_{17}$, est un antibiotique antifongique de la famille des polyènes macrocycliques, produit par une souche de *Streptomyces nodosus*, il est indiquée contre les infections fongiques invasives à *Aspergillus* et *Candida*, dans les cryptococcoses

neuroméningées chez les sujets infectés par le HIV et les immunodéprimés (Roguet *et al.*, 2014).

Pour ce faire, la première partie de notre travail est consacrée à la description de données bibliographiques relatives aux huiles essentielles et aux champignons d'intérêt médical. La seconde partie, consacrée à l'étude expérimentale, concerne la mise en évidence de l'activité antifongique des huiles essentielles des plantes investiguées, sur les deux souches tests et les résultats obtenus sont comparés à ceux des deux antifongiques de synthèse, à savoir le Fluconazole et l'Amphotéricine B.

Enfin, ce travail est clôturé par une conclusion générale et des perspectives d'avenir.

**ETUDE
BIBLIOGRAPHIQUE**

CHAPITRE I : GENERALITES SUR LES HUILES ESSENTIELLES

I-1. Définition des l'huiles essentielles

La pharmacopée européenne définit les huiles essentielles comme étant « un produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur, soit par distillation sèche, soit par procédé mécanique approprié sans chauffage » (Ek *et al.*, 2014).

L'huile essentielle est issue de l'essence aromatique concentrée qui sont localisées aux différentes parties de la plante. Selon (Pielquin, 2015), l'absorption d'une seule goutte d'huile essentielle représente l'ingestion de plusieurs dizaines voire même centaines de la plante d'origine d'où elles ont été extraites. Elle est généralement volatile, ce qui explique qu'elle s'évapore très rapidement. Les principes aromatiques des plantes sont des gouttes minuscules qui se forment dans les chloroplastes des feuilles, c'est-à-dire les organites dans lesquels s'effectue la photosynthèse. Elles se combinent par la suite avec du glucose et sont transportées dans toutes les parties de la plante. Une huile essentielle est donc une sécrétion naturelle qui s'effectue dans une partie du végétal : la feuille, l'écorce ou la fleur.

Aussi une huile essentielle ne contient pas d'acide gras et de ce fait ne rancit pas contrairement à l'huile végétale (Moro-Buronzo, 2008).

I-2. Localisation des huiles essentielles dans la plante

Les huiles essentielles sont tirées de différentes parties de la même plante et ont parfois des actions totalement différentes. Les HE ont pour origine aussi bien les racines, que le tronc (pour la cannelle par exemple), que les feuilles, les fleurs, les fruits ou encore la résine (pour le benjoin par exemple) (Pielquin, 2015).

I-3. Composition des huiles essentielles

La composition chimique des huiles essentielles est variable. Elle varie en fonction de l'origine botanique (espèce, organe), du mode de préparation et de la durée de conservation (Ghestem *et al.*, 2001). Les composants principaux des HE sont regroupés en grandes familles : les esters, les phénols, les aldéhydes, les cétones, les alcools, les terpènes, les acides, et les sesquiterpènes (Moro-Buronzo, 2008).

Le tableau 1 résume les composés les plus communs que l'on trouve dans les HE et sont classées selon leurs poids moléculaires, leurs températures d'ébullition et leur solubilités dans l'eau (Farhat, 2010).

Tableau 1 : Composition chimique des HE (Farhat, 2010).

	Formule moléculaire	Température d'ébullition	Solubilité dans l'eau (g.L ⁻¹)
<i>Monoterpènes</i>			
Limonène	C ₁₀ H ₁₆	175.4	< 10 ⁻³
Pinène	C ₁₀ H ₁₆	157.9	< 10 ⁻³
Sabinene	C ₁₀ H ₁₆	164	< 10 ⁻³
Myrcène	C ₁₀ H ₁₆	167	< 10 ⁻³
γ-Terpinène	C ₁₀ H ₁₆	183	< 10 ⁻³
para-Cymène	C ₁₀ H ₁₆	173.9	< 10 ⁻³
<i>Sesquiterpènes</i>			
β-Caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	268.4	< 10 ⁻³
α-Santalene	C ₁₅ H ₂₄	247.46	< 10 ⁻³
α-Zingiberene	C ₁₅ H ₂₄	270.7	< 10 ⁻³
β-Curcumene	C ₁₅ H ₂₄	266	< 10 ⁻³
<i>Diterpène</i>			
Phytol	C ₂₀ H ₄₀ O	335.5	< 10 ⁻³
<i>Alcools</i>			
Géraniol	C ₁₀ H ₁₇ OH	229.5	0.67
Linalool	C ₁₀ H ₁₇ OH	198.5	0.67
<i>Aldéhydes</i>			
Citral	C ₁₀ H ₁₆ O	210.9	2.61
Cuminic aldéhyde	C ₁₀ H ₁₂ O	354.6	0.26
<i>Ketones</i>			
Camphor	C ₁₀ H ₁₆ O	207.4	0.92
Carvone	C ₁₀ H ₁₄ O	230.5	1.60
<i>Phénols</i>			
Thymol	C ₁₀ H ₁₄ O	233	0.85
Eugénol	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	255	2.52
<i>Acétates</i>			
Neryl acétate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	274.5	0.71
Linalyl acétate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	220	0.57
<i>Oxydes</i>			
1,8-Cineol	C ₁₀ H ₁₈ O	174.8	5.8×10 ³
Linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	198.5	0.67

I-3.1. Les terpènes

Sont les molécules les plus répandues dans l'ensemble des HE. Ils sont connus pour leur action stimulante, tonique, possèdent des propriétés antivirales même à très faibles concentrations (Moro-Burton, 2008), ainsi que des propriétés antiseptiques (Poirot, 2016). Les terpènes sont des hydrocarbures formés d'un nombre pair ou impair d'unités de 2-méthylbuta-1,3-diène ou appelé isoprène. Selon le nombre de carbone composant la molécule on distingue : les monoterpènes (C_{10}), les sesquiterpènes (C_{15}), les diterpènes (C_{20}), les triterpènes (C_{30}) et les tétraterpènes (C_{40}). Les terpènes les plus volatiles généralement présents dans les HE sont ceux qui ont un poids moléculaire peu élevé, telles que les mono et sesquiterpènes (Figure 1) (Farhat, 2010).

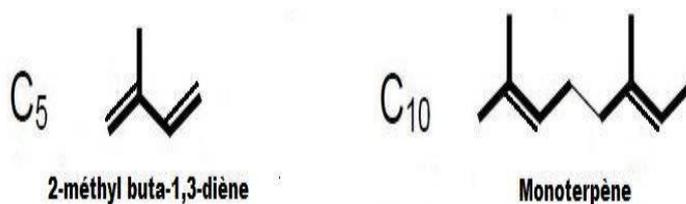


Figure 1 : Structure chimique de l'isoprène (2-méthylbuta-1,3-diène) et d'un monoterpène (Poirot, 2016).

I-3.2. Les aldéhydes aromatiques

Il y existe deux types d'aldéhydes (Figure 2) :

- Les aldéhydes terpéniques comme les citrals (néral, géraniol), le citronellal. Ils dégagent une forte odeur citronnée. On leur attribue des propriétés antiseptiques des voies respiratoires, antibactériennes, bactéricides sur les bactéries (Poirot, 2016) vasodilatatrices, relaxantes, etc....
- Les aldéhydes aromatiques, comme le cinnamaldéhyde (du cannellier). Ont principalement une action anti-infectieuse (Poirot, 2016).



Figure 2 : Structure chimique du géraniol et du cinnamaldéhyde (Poirot, 2016).

I-3.3. Les coumarines

Les coumarines (Figure 3) se trouvent dans de nombreuses espèces végétales, mais sont présentes à des concentrations faibles, voire à l'état de traces. Elles ont une grande puissance d'action, notamment sur le système nerveux central par leur effet sédatif. Elles ont un effet anticoagulant, exemple « les coumarines du marronnier d'Inde (*Aesculus hippocastanum*) contribuent à fluidifier le sang, alors que les furanocoumarines contenu dans le céleri (*Apium graveolens*) soignent les affections cutanées » (Belkhouja, 2016 ; Poirot, 2016).

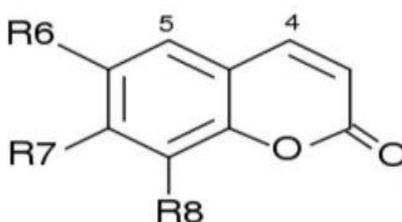


Figure 3 : Structure chimique des coumarines (Poirot, 2016).

I-4. Critères de qualité des huiles essentielles

La dénomination botanique de la plante aromatique productrice de l'HE est essentielle. Une HE diffère par sa composition et ses propriétés d'une espèce à une autre appartenant à la même plante. Pour éviter toute confusion, la norme ISO 4720 fournit une liste de nomenclature botanique des plantes utilisées pour la production des HE (ISO 4720:2009. *En ligne*, consulté le 08/03/2018), en voici quelques exemples :

Alliacées : ail, oignon.

Apiacées : aneth, anis vert, céleri, carvi, coriandre, cumin, carotte, fenouil, persil.

Astéracées : estragon, camomille.

Brassicacées : moutarde.

Lamiacées : lavande, menthe, basilic, romarin, sauge, thym.

Liliacées : anis étoilé.

Myristacées : noix de muscade.

Myrtacées : eucalyptus, tea tree citronnée, piment, arbre d'anis, girofle.

Pipéracées : poivre noir.

Verbénacées : verveine odorante.

Zingibéracées : gingembre, cardamome.

La qualité et l'efficacité d'une HE dépendent également de la nature du sol sur lequel a poussé la plante, le climat, le moment de la récolte, la méthode d'extraction, la

conservation,...etc. Tout ceci fait qu'il n'y a pas deux plantes identiques ayant le même parfum dans la nature (Moro-Buronzo, 2008).

I-4.1. Origine géographique

L'écologie végétale étudie l'interaction entre les végétaux avec le milieu dans lequel ils vivent. Les différents facteurs du milieu sont classés en : facteurs climatiques (température lumière, humidité, vent,...), facteurs édaphiques (structure et composition du sol) et facteurs vivants (influence des autres végétaux, animaux et de l'homme) (Ghestem *et al.*, 2001).

Selon leur mode de distribution des plantes médicinales, on distingue les plantes utilisées en nature ou dites « plantes de cueillette », et celles destinée pour l'industrie pharmaceutique, qui sont cultivées après traitement préalable, ou « plante de culture ». Les plantes de cueillette présentent un certains nombre d'inconvénients : dispersion géographique, irrégularité de leur croissance, de plus leur récolte nécessite une main d'œuvre qualifiée et abondante. Par contre les plantes de culture offrent une matière première abondante, homogène et de bonne qualité une récolte aisée car il n y a pas de dispersion géographique, et enfin un faible risque de substitution ou de falsification (Paris, 1981).

Les plantes de culture nécessitent des conditions de culture, de récolte et de conservation afin de garantir leur qualité avant utilisation.

I-4.2. Mode de culture

Les conditions de culture des plantes font intervenir deux facteurs :

- **Les facteurs extrinsèques** à la plantes, c'est-à-dire le climat et la qualité du sol. Le climat intervient par la température, l'humidité, le vent et la luminosité. Le sol influencent par ces propriétés physiques (porosité, perméabilité), ces propriétés chimiques (pH, disponibilité et équilibre entre les minéraux, présence d'oligo-éléments), et par sa richesse biologique (présence de microflore).
- **Les facteurs intrinsèques** ou endogènes à la plantes, ce sont les facteurs qui agissent sur le patrimoine génétique des plantes (c'est-à-dire sélection par mutations ou hybridation. le mode de culture des plante fonction du mode de reproduction de celles-ci, il s'effectue par voie sexuée (production de graines), ou par voie asexuée ou végétative (par éclat de souches, bulbilles, rejets, stolons, boutures, ...) (Paris, 1981).

I-4.3. Le stade de développement botanique

La récolte des plantes médicinales est une phase importante, seuls les plants sains doivent être récoltés. Par ailleurs, la récolte doit être faite par temps sec, sauf pour les écorces qui se détachent plus facilement après une période humide. « Les plantes à huile essentielle doivent être cueillies le matin, avant le lever du soleil » (Paris, 1981). La phase de développement des plantes est aussi importante lors de la cueillette, « pour les FLEURS, c'est au début de la floraison. Pour les FEUILLES, avant et pendant la floraison. Pour les RACINES, au début du printemps. Pour les FRUITS, au moment où ils sont mûrs » (Trében, 1985).

I-4.4. Le chémotype

Une même plante qui croit dans des lieux différents, que ce soit par leurs situations géographiques (altitude et latitude), que par la nature des sols, peut sécréter des essences très différentes. « Pour différencier les huiles essentielles extraites de chacune de ces plantes, on utilise le terme de "chénotypes", mot dérivé de "chimiotypes" signifiant simplement : "types chimiques" » (Franchomme, 2001). Ces différences de composition peuvent être extrêmement importantes et changer totalement les propriétés chimiques ou biologiques de l'HE, s'est pour cela qu'il faut bien connaître les chémotypes, leur non-connaissance peut être à l'origine de graves accidents. Cette variabilité chimique peut même apparaître au gré des saisons, par exemple le thym vulgaire (*Thymus vulgaris*): le géraniol est présente en hiver, et est remplacée par de l'acétate de géranyle en été.

Ce qui explique ces variations c'est probablement les enzymes de biosynthèse, dont de nombreuses métallo-enzymes issus du sol. La nature physico-chimique du sol n'offre pas à ces plantes les mêmes oligo- et microéléments. Aussi, les enzymes étant également sensibles aux radiations lumineuses, le changement de rayonnement solaire agit sur la synthèse aromatique. Ainsi, en bord de mer, les infrarouges dominant, alors qu'en altitude, les ultraviolets sont plus abondants (Franchomme, 2001).

I-5. Activité antimicrobienne des huiles essentielles

L'activité antimicrobienne des HE extraites des plantes aromatiques a été largement décrite *in vitro* (Hans, 2007 cité dans Makhloufi, 2010), et elles présentent également un fort pouvoir antifongique (Chami, 2005 ; Giordani et Kaloustian, 2006; De Billerbeck, 2007 ; Juhas, 2009, cité dans Makhloufi, 2010).

I-5.1. Activité antifongique

L'action antifongique des huiles essentielles est due à une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique suivie d'une rupture de celle-ci entraînant une fuite du contenu cytoplasmique et donc la mort de la levure » (Mann *et al.*, 2000 cité dans Makhloufi, 2010). Les composés terpéniques des HE et plus précisément leurs groupements fonctionnels phénoliques et les aldéhydes réagissent avec les enzymes membranaires et dégradent la membrane plasmique des levures (Giordani et Kaloustian, 2006 cité dans Makhloufi, 2010).

I-5.2. Activité antibactérienne

Les composés phénoliques des HE comme l'eugénol, le thymol et le carvidol ont une action antibactérienne contre un large spectre de bactéries (*Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Clostridium jejuni*, *Lactobacillus sake*, *Staphylococcus aureus* et *Helicobacter pylori* (Pauli, 2001; Fabian *et al.*, 2006 cité dans Piochon, 2008).

Les HE ont l'avantage de ne pas détruire la flore intestinale qui nous est si précieuse contrairement aux antibiotiques allopathiques (Pielquin, 2015). Elles agissent selon deux modes d'action, soit bactériostatique en bloquant la multiplication des cellules bactériennes soit bactéricide en les tuant (Mnayer, 2014).

I-5.3. Activité antivirale

Les virus sont très sensibles aux molécules aromatiques contenues dans les huiles essentielles (Moro-Buronzo, 2008). Dans la lutte contre les virus, les composés hydroxyliques (phénol et monoterpénol) sont les plus virucides. Divers essais du pouvoir virucide des HE ont été effectués par des laboratoires, dont le laboratoire de virologie de Toulouse a testé l'huile essentielle de *Melaleuca quinquenervia cineolifera* (niaouli) sur le virus de l'Herpes. Après un temps de contact de 15 minutes *in vitro*, l'activité virucide se traduit par une chute supérieure à 40000 (Penntybio, *En ligne*, consulté le 08/03/2018).

I-5.4. Activité antiparasitaire

Les molécules aromatiques (généralement les phénols) ont une action puissante contre les parasites. Les HE du thym à linalol et de la sarriette des montagnes sont d'excellentes antiparasitaires (Mayer, 2012). Les HE sont « eubiotiques », (Ngassapa, Runyoro, Harvala & Chinou, 2003 cité dans Randrianarivelo, 2010), c'est à dire qu'elles tuent les parasites sans

interférence avec l'organisme hôte, contrairement aux antibiotiques. Elles agissent généralement à faible dose. Les essences de sarriette, cannelle, thym, girofle, lavande, eucalyptus sont les plus antiseptiques. Certains de leurs composés tels que le citral, le géraniol, le linalol et le thymol sont en moyenne 7 à 10 fois plus antiseptiques que le phénol (Bruneton, 1999 ; Ngassapa *et al.*, 2003 cité dans Randrianarivelo, 2010).

I-5.5. Activité antiseptique

Les propriétés antiseptiques et désinfectantes sont souvent attribuées aux HE possédant des fonctions aldéhydes ou des terpènes comme celle de l'*Eucalyptus radiata* (Mnayer, 2014).

I-6. Techniques d'extraction des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont enfermées à l'intérieur de leurs cellules végétales, leur mode d'extraction est défini en fonction de la partie végétale les contenant. (Moro-Buronzo, 2008). Plusieurs méthodes d'extraction permettent de récupérer les HE telles que, l'hydrodistillation l'entraînement à la vapeur, l'hydro-diffusion. Elles sont ensuite séparées et récupérées de la phase aqueuse par différents procédés physiques. Elles sont liquides à température ambiante (20-25°C), de consistance rarement visqueuse. A des températures plus faibles certaines HE cristallisent (exemple la menthe et l'anis). Ces HE sont volatiles (ce qui permet leur extraction à la vapeur). Leur densité est généralement inférieure à celle de l'eau, sont non miscibles dans les solutions aqueuses, mais solubles dans les solvants organiques, et sont généralement incolore (Poirot, 2016). Les HE sont sensibles aux rayons UV, donc il convient de les conserver à l'abri de la lumière (Farhat, 2010).

I-6.1. Extraction par hydrodistillation

L'hydrodistillation est la méthode la plus ancienne et la plus simple utilisée pour extraire les HE des plantes. Le procédé consiste à immerger les matières végétales (fleurs, rameaux, racines, herbes, ...) dans un ballon en verre avec une quantité d'eau « pouvant varier de deux à six fois la quantité de matières premières » (Franchomme, 2001). Le système est mis à l'ébullition, la chaleur va provoquer l'éclatement des cellules végétales et la libération des molécules aromatiques. Le mélange azéotropique « eau + HE » va être refroidi et condensé dans le réfrigérant (Figure 4). Enfin le mélange va être récupéré puis séparé en deux phases selon leurs différences de densité : la phase organique composée de l'HE et la phase aqueuse (hydrolat) (Farhat, 2010).

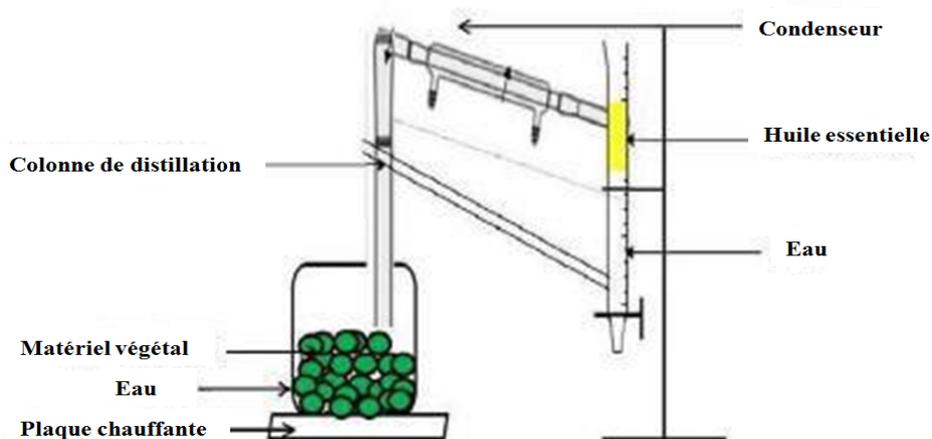


Figure 4 : Extraction par hydrodistillation (Mnayer, 2014).

I-6.2. Extraction par solvants

L'extraction par solvant organique est une technique qui a été élaborée au 18^{ème} siècle. C'est la technique la plus utilisée surtout par les industries car ses rendements sont meilleurs. Les solvants les plus utilisés sont l'hexane, le cyclohexane, l'éthanol, l'acétone (Duval, 2012).

I-6.3. Extraction au CO₂ supercritique

C'est une technique moderne, qui consiste à faire exploser les poches végétales contenant l'HE par exposition de la partie de la plante au dioxyde de carbone à haute pression. (Moro-Buronzo, 2008). Le principe de cette technique consiste à liquéfier le dioxyde de carbone par refroidissement, puis comprimer à une pression d'extraction définie (état supercritique). Il sera ensuite injecté dans l'extracteur contenant la matière végétale. Le liquide va se détendre pour se transformer à l'état gazeux, pour être conduit vers un séparateur qui permettra de récupérer l'extract et le solvant séparément (Belkhoudja, 2016). Le principe de la technique est illustré dans la figure ci-dessous :

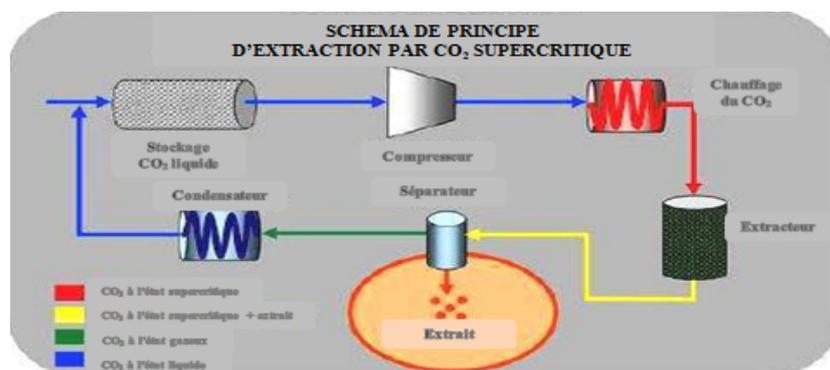


Figure 5 : Principe d'extraction par CO₂ supercritique (Duval, 2012).

I-6.4. Extraction aux ultrasons

Les ultrasons sont des ondes mécaniques qui se déplacent dans un milieu à une fréquence supérieure à la limite maximale d'audibilité de l'oreille humaine. Les ultrasons utilisés pour l'extraction des arômes et autres molécules végétale ont une intensité puissante qui se situe entre 20 et 100 kHz. Il y a deux types d'appareil à ultrason, il est sous forme de bac à ultrasons, ou il est sous forme d'une sonde à ultrasons (Figure 6). Les glandes contenant les HE étant présentes à la surface des plantes aromatiques, l'implosion des bulles de cavitations provoquées par les oscillations des ultrasons, vont détruire les glandes qui libèrent les HE dans le milieu environnant (Mnayer, 2014).

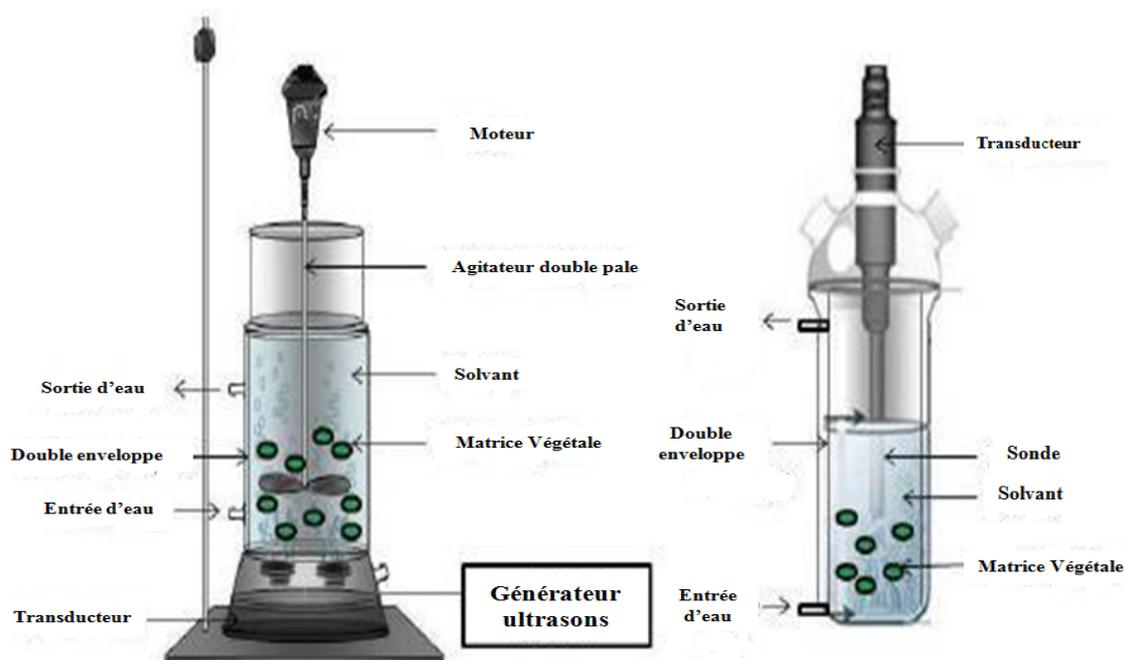


Figure 6 : Extraction aux ultrasons (Mnayer, 2014).

I-6.5. Extraction sans solvant assisté par micro-ondes

Lorsqu'une onde électromagnétique rencontre un matériau, une partie de cette onde est réfléchiée à la surface, l'autre, généralement plus importante y pénètre. L'énergie de cette onde est transformée en énergie thermique (Farhat, 2010).

L'extraction sans solvant assisté par micro-ondes ou « Solvent Free Microwave Extraction (SFME) » est une technique qui a été développée et brevetée en 2004 par Chemat et *al.* La SFME est une technique très récente utilisée pour l'extraction des HE assistée par micro-ondes, sans solvant et sans eau, à pression atmosphérique. L'appareil se compose de quatre parties (figure 7): un réacteur où sera placée la matière végétale seule, un four à micro-ondes un système de réfrigération, et un essencier où sera recueilli l'HE (Figure 8) (Chemat *et al.*, 2013).

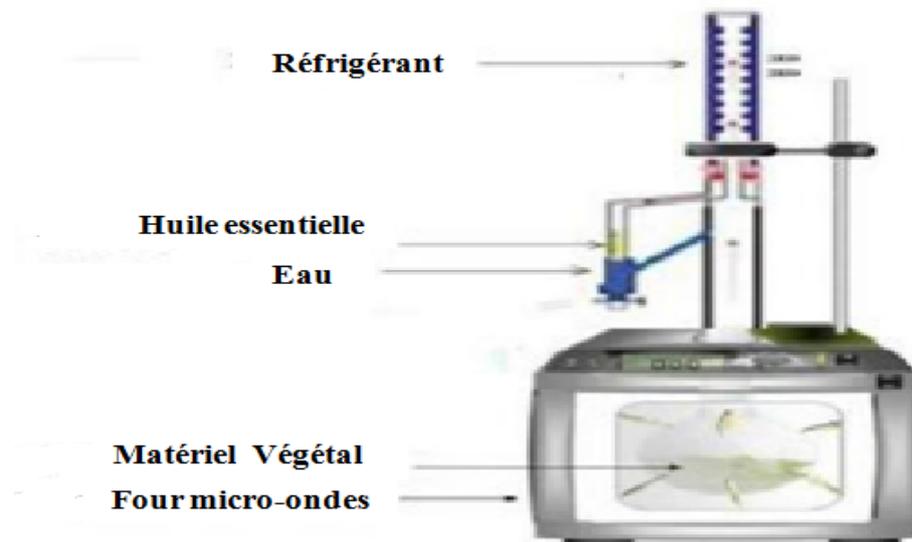


Figure 7 : Différentes parties d'un appareil d'extraction assisté par micro-ondes (Mnayer, 2014).

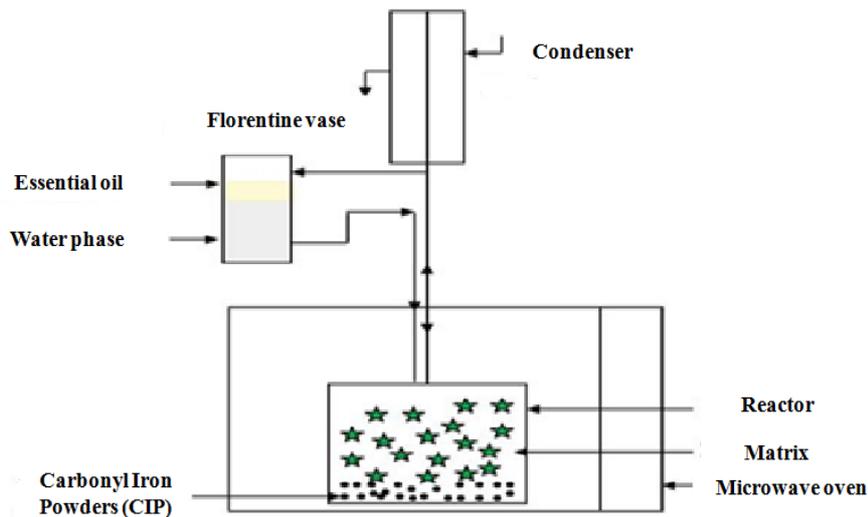


Figure 8 : Extraction sans solvant assisté par micro-ondes ou « Solvent Free Microwave Extraction (SFME) » (Chemat *et al.*, 2013).

Le principe de la SFME est relativement simple, il s'agit d'une distillation sèche assistée par micro-ondes. Elle consiste à placer la matière végétale fraîche dans le réacteur, sans ajouter d'eau ou solvant. Les radiations chauffent l'eau de constitution, ce qui va permettre de casser les glandes contenant l'HE. L'huile ainsi libérée va être entraînée par la vapeur d'eau (eau de la matière végétale). Un système de refroidissement placé à l'extérieur du four micro-ondes permet la condensation continue du distillat, composé d'eau et d'huile essentielle. Cette technique a été appliquée sur plusieurs plantes fraîches et sèches comme les épices, les herbes aromatiques et les agrumes (Chemat, *et al.*2013).

CHAPITRE II : GENERALITES SUR LES PLANTES INVESTIGUEES

II-1. *Allium sativum*

L'ail est une plante potagère, monocotylédone composée par des bulbes (tête d'ail). Il a une odeur forte et caractéristique des alliées, et un goût piquant et acide. Il est plus communément appelé : ail, allium, camphre des pauvres, lai, la mélasse des pauvres, ...etc. (WHO, 1999). « Allium » provient du celtique « All » qui signifie « brûlant » en raison de la saveur du bulbe, et « sativum » qui signifie « cultivé » (Jung, 2005).

Il est généralement utilisé comme condiment dans l'alimentation humaine, néanmoins certaines études lui confèrent des propriétés curatives et antimicrobiennes. Les principes actifs de l'ail sont des composés soufrés (alliine) responsable de l'activité hypocholestérolémie, antiagrégant plaquettaire et antibiotique (WHO, 1999).

II-1.1. Origine et répartition géographique

L'ail provient de l'Asie centrale. Il y a environ 10.000 ans, il s'est largement répandu en Egypte, en Europe et dans le bassin méditerranéen, transporté par les marchands des routes commerciales. Il croît sans intervention humaine en Sicile, en Espagne, en Egypte et en Algérie (Jung, 2005). Son lointain ancêtre, *Allium longicuspis*, croît dans les steppes sauvages en Afghanistan et en Iran. L'ail des bois ou trilobé, *Allium tricoccum*, est une espèce qui pousse en Amérique du Nord. À la suite d'une récolte commerciale intensive, il est devenu de plus en plus rare. Au Québec, il bénéficie d'une protection juridique, à titre d'espèce vulnérable. Cependant, l'ail cultivé, *Allium sativum*, ne dérive pas directement des espèces sauvages, mais plutôt d'une très lente évolution génétique issue d'un travail de sélection par l'homme (Mazouzi, 2011).

II-1.2. Classification dans la systématique botanique

L'ail appartient à l'ordre des Liliales, à la famille des Liliacées, et au genre *Allium*. Le nom botanique de l'ail est *Allium sativum* L. (Jung, 2005).

Règne	Plantae
Sous-règne	Viridiplantae
Division	Tracheophyta
Classe	Magnoliopsida
Super ordre	Lilianae (monocotylédones)
Ordre	Asparagales
Famille	Amaryllidaceae
Genre	<i>Allium</i>
Espèce	<i>Allium sativum</i> (ITIS Taxonomic, <i>En ligne</i> , consulté le 23/03/2018).

II-1.3. Description morphologique

L'ail est une plante herbacée, vivace à bulbe formé de 3 à 15 gousses appelées aussi caïeux et qui sont en fait des bourgeons tubérisés par lesquels se fait la multiplication de la plante. L'ail se divise en deux sous-espèces connues sous le nom d'ail à tige dure (*ophioscorodon*) plus résistante au froid, et ail à tige molle (*sativum*) s'adapte mieux aux régions chaudes et ne produit pas de fleurs (Mazouzi, 2011). la partie souterraine se compose de bulbes (tête d'ail) la partie aérienne se compose d'une tige, qui peut atteindre 30 à 60 centimètres de hauteurs et de 1,0 à 2,5 centimètres de large (WHO, 1999) et se termine par des fleurs blanchâtres ou rosées, mêlées à des bulbilles en ombrelles. Les feuilles sont linéaires, allongées, plates étroites et se termine en pointe, elles naissent du bulbe et s'emboitent les unes sur les autres pouvant atteindre le milieu de la tige (Figure 9) (Jung, 2005).

Le bulbe ou tête d'ail est composé d'une dizaine de bulbilles (caïeux), communément appelé « gousses ». Ils sont blanchâtres ou rosés, ovoïdes, oblongs, de 5 à 10 millimètres de diamètre et disposées de manière concentrique, et enveloppés d'une tunique plus ou moins résistante et cartilagineuse (WHO, 1999 ; Jung, 2005).



Figure 9 : Plante et fleur d'ail (Jung, 2005).

II-1.4. Propriétés thérapeutiques

Les données cliniques ont prouvé l'efficacité de l'ail dans le traitement de l'hypertension légère. Les Pharmacopées parlent de traitements contre les infections des voies respiratoires des voies urinaires, de la teigne et du rhumatisme. Les usages traditionnels de l'ail non soutenu par des essais expérimentaux et cliniques décrivent son utilisation dans le traitement des troubles digestifs de l'estomac, dans les symptômes emménagogues, comme

ayant des propriétés expectorante et sédative, pour traiter l'asthme et la bronchite, et pour favoriser la croissance des cheveux (WHO, 1999).

Les essais expérimentaux *in vivo* et *in vitro* ont démontrés que l'ail frais, l'HE et les extraits font abaisser le cholestérol et les lipides plasmatiques (WHO, 1999).

L'ail a un large spectre d'activité antibactérienne et antifongique. L'HE, l'hydrolat et les extraits d'ail inhibent la croissance *in vitro* des espèces de *Bacillus*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella sonnei*, *Erwinia carotovora*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, *Proteus* spp, *Streptococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida* spp, *Cryptococcus* spp, *Rhodotorula rubra*, *Torulopsis* spp, *Trichosporon pullulans*, et *Aspergillus niger*. Son activité antimicrobienne a été attribuée à l'allicine, l'un des constituants actifs de l'ail. Cependant, l'allicine est relativement composé instable et peut ne pas avoir d'activité antibactérien *in vivo*. L'ajoène et le trisulfure de di-allyle (deux composés de l'ail) ont aussi une activité antibactérienne et antifongique (WHO, 1999).

L'ail a été utilisé dans le traitement des vers ronds (*Ascaris strongyloides*) et l'ankylostome (*Ancylostoma caninum* et *Necator americanus*) (WHO, 1999).

II-2. *Zingiberis rhizoma*

Le gingembre est une plante herbacée, vivace avec un rhizome souterrain ramifié qui pousse dans les régions ensoleillées et humides. Dans l'Égypte antique, le gingembre entrainait dans la composition des procédés de momification. L'homme l'utilise depuis plus de 3000 ans comme épice, mais aussi pour ses propriétés médicinales. (Gigon, 2012). Le gingembre possède plusieurs appellations de par le monde, on le nomme, gingembre, gingembre commun, racine de gingembre, gengibre, zanjabeel, zangabil, zingiberis rhizoma, zinjabil, zingiber, zinam, etc.... (WHO, 1999).

II-2.1. Origine et répartition géographique

Le gingembre est originaire de l'Inde, où il a été cultivé et dans tout le Sud-est asiatique jusqu'en Chine, en Indonésie et aux Philippines et aussi en Afrique tropicale (Nigeria) et aux Caraïbes. Ce condiment est arrivé en Europe durant l'empire romain dès le 1^{er} siècle grâce aux Phéniciens. Malgré sa répartition sur tous les continents, plus de 50% de sa production mondiale provient de l'Inde (Gigon, 2012).

II-2.2. Classification dans la systématique botanique

Zingiber officinale (Roscoe), plus connu sous le nom de gingembre, appartient à la classification suivante :

Règne	Plantae (Haeckel, 1866)
Classe	Equisetopsida (C.Agardh, 1825)
Sous classe	Magnoliidae (Novák ex Takht., 1967)
Ordre	Zingiberales (Griseb., 1854)
Famille	Zingibéraceae (Martinov, 1820)
Sous-famille	Zingibéroideae (Blume, 1844)
Genre	<i>Zingiber</i> (Mill., 1754)
Espèce	<i>Zingiber officinale</i> (Roscoe, 1807) (INPN, <i>En ligne</i> , consulté le 07/06/2018).

II-2.3. Description morphologique

La partie souterraine comprend le rhizome qui est constitué de tubercules globuleux ramifiés. La peau du rhizome est de couleur chamois jaunâtre ou brun clair à l'extérieur. L'aspect est strié longitudinalement, fibreux et granuleux. Intérieurement, le rhizome est brun jaunâtre montrant un endoderme jaune et de nombreux faisceaux fibrovasculaires dispersés sur toute la surface. Le rhizome a une odeur aromatique avec une saveur piquante (Figure 10) (Gigon, 2012 ; WHO, 1999).

La partie aérienne de la plante comprend la tige qui mesure 1,50 mètre en moyenne, mais peut atteindre 3 mètres de hauteur.

Les feuilles sont lancéolées, pointues et lisses, de 5 à 30 centimètres de longueur atteignant 8 à 20 millimètres de largeurs, de couleur vert pâle. Les fleurs sont parfumées, de couleur blanche à jaunâtre munies de bractées pourpres (voir photo). La floraison a lieu entre les mois d'août et de novembre.

En raison de son aspect esthétique et de son adaptabilité au climat chaud, le gingembre est souvent utilisé comme plante décorative pour l'aménagement paysager (Figure 11) (Gigon, 2012 ; WHO, 1999).



Figure 10 : Plante et rhizome de gingembre (Mister Ginseng, *En ligne*, consulté le 09/05/2018 ; Moving tahiti, *En ligne*, consulté le 09/05/2018).

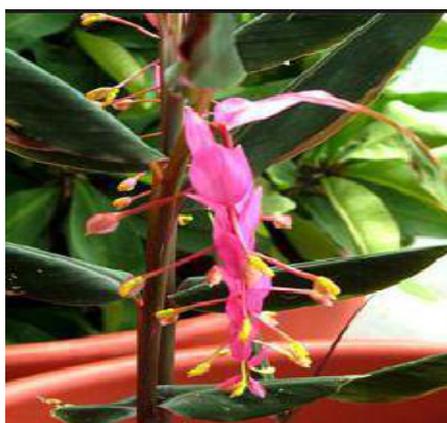


Figure 11 : Feuilles et fleurs de gingembre (Gerbeaud.com, *En ligne*, consulté le 09/05/2018).

II-2.4. Propriétés thérapeutiques

Les essais cliniques ont prouvé l'efficacité du gingembre contre les nausées et les vomissements liés au mal de transport, les nausées postopératoires, les vomissements durant la grossesse et le mal de mer. Les Pharmacopées décrivent le traitement des maux d'estomac des flatulences, des coliques, des vomissements, de la diarrhée, des spasmes et autres maux d'estomac par le gingembre. Le gingembre en poudre est employé dans le traitement du rhume et de la grippe, pour stimuler l'appétit, en tant que stupéfiant et en tant qu'agent anti-inflammatoire et dans le traitement de la migraine et des troubles rhumatismaux et musculaires. Dans les traitements traditionnels par le gingembre non soutenue par des essais expérimentaux et cliniques décrivent l'utilisation du gingembre contre les maux de dents l'insomnie, la calvitie et les hémorroïdes et pour augmenter la longévité (WHO, 1999).

CHAPITRE III : LES CHAMPIGNONS D'INTERET MEDICAL

III-1. Généralités

À la fin du siècle dernier s'est développé un nouveau type de pathologie, d'abord restreinte au Pays développés puis s'est étalée à d'autres régions: la pathologie «opportuniste».

L'émergence de cette pathologie est largement favorisée par les modifications éco-éthologiques des populations, l'évolution rapide des techniques médico-chirurgicales et l'immunodépression consécutive à l'infection par le VIH et aux nouvelles thérapies immunosuppressives. En effet, ces facteurs facilitent le développement et l'expression du pouvoir pathogène d'organismes saprophytes (Grillot, 1995).

Ces dernières années, l'augmentation des infections fongiques montre que, c'est au sein de l'embranchement des mycètes que se trouvent les microorganismes, potentiellement, les plus adaptés à un tel comportement. Les candidoses, dues aux levures du genre *Candida*, sont les infections opportunistes les plus fréquentes et leur fréquence a doublé entre les années 80 et 90. Du coup, elles représentent désormais plus de 80% des infections à levures (Eggimann *et al.*, 2003). Parmi les candidoses, l'infection par *Candida albicans*, commensal du tractus digestif humain, est la plus commune et représente plus de 60% des levures isolées chez l'homme. Ainsi, *Candida albicans* est responsable d'infections qui, par leur fréquence et leur gravité, se situent au premier rang des infections fongiques (Bodey *et al.*, 1984 ; Samaranayake *et al.*, 2002).

Les aspergilloses, infections opportunistes dues aux champignons du genre *Aspergillus* sont aussi fréquentes. Parmi les 300 espèces qui composent ce genre, *Aspergillus fumigatus* est responsable de 80% des aspergilloses humaines (Anofel, 2007). *Aspergillus niger* fréquemment retrouvé dans les aspergilloses de l'appareil respiratoire (l'aspergillome l'aspergillose pulmonaire invasive et immuno-allergique), les aspergilloses superficielles (les otomycoses, l'onxyis aspergillaire, les aspergilloses oculaires et cutanées) et des formes profondes (cérébrales, sinusiennes, hépatiques, péritonéales, rénales, cardiaques, osseuses et cutanées) (Anofel, 2014).

III-2. *Candida albicans*

III-2.1. Habitat et répartition géographique

La levure *C. albicans* est dimorphe, caractérisée par deux formes, la forme normale appelée « levure » et la forme infectieuse appelée « mycélium ». Elle n'est jamais retrouvée sur la peau saine, elle se plaît à vivre dans des endroits particulièrement chauds et humides du corps humain, sa nourriture préférée est le glycogène, un sucre complexe des cellules épithéliales formant la peau et les muqueuses. Plus les cellules du corps contiennent de glycogène, plus *Candida* s'en nourrit et se développe (Lebeau, 2004 ; Beaudy, 2008).

Au niveau des muqueuses digestives et vaginales, la levure se présente sous forme de blastospores, considérées comme la forme saprophyte qui vit en symbiose avec l'organisme hôte. En revanche, lorsque le délicat équilibre entre la forme commensale et les défenses immunitaires est rompu, cette étroite symbiose se transforme en parasitisme, résultant en une maladie infectieuse appelée candidose. Au niveau des tissus infectés, *Candida albicans* est retrouvée simultanément sous les formes de blastospores et de mycélium. Alors que la forme blastospore reste non-invasive, la forme mycélienne est capable de pénétrer les muqueuses (Lagane, 2007).

Candida albicans est un champignon cosmopolite dont les fréquences d'isolement montrent que chez des sujets sains la levure se répartit différemment en fonction des sites de prélèvement: peau (3%), vagin (13%), tractus ano-rectal (15%), cavité buccale (18%) estomac et duodénum (36%), et jéjunum et iléon (41%). Le réservoir principal est donc le tube digestif où la fréquence de portage varie selon les sujets. Ces résultats sont toutefois à observer avec précaution dans la mesure où les techniques de prélèvements ne sont pas toujours identiques et les sites de prélèvements ne présentent pas toujours un environnement homogène. Par exemple, les fréquences d'isolement au niveau de la peau sont différentes si l'on s'intéresse aux mains, aux aisselles ou aux cheveux. La contamination est essentiellement inter humaine, soit par transmission fécale, soit par contact direct (salive sécrétions, mains).

En milieu hospitalier, les levures du genre *Candida* et en particulier *Candida albicans* représentent la cause majeure des infections nosocomiales opportunistes d'origine mycosique. *Candida albicans* peut aussi être isolée de manière exceptionnelle dans la nature (sol, plante atmosphère, eau...) mais cela résulte en général d'une contamination fécale (Lagane, 2007).

III-2.2. Classification taxonomique

Règne	Fungi
Division	Ascomycota
Subdivision	Saccharomycotina
Classe	Saccharomycetes
Ordre	Saccharomycetales
Famille	Debaryomycetaceae
Genre	<i>Candida</i>
Espèce	<i>Candida albicans</i> (Berkhout <i>et al.</i> , 1923).

III-2.3. Morphologie

Candida albicans est une levure non capsulée, non pigmentée, et aérobie. Cette levure diploïde, dont le matériel génétique se répartit en huit chromosomes (Chu *et al.*, 1993), se reproduit de façon asexuée par bourgeonnements multilatéraux d'une cellule mère (le blastospore) (Graser *et al.*, 1996), formant ainsi des colonies blanches crémeuses.

Au niveau morphologique, cette levure peut mesurer de 3 à 15 µm et est caractérisée par un polymorphisme que l'on peut retrouver *in vitro* et *in vivo* et qui lui permet de se soustraire aux défenses liées à l'immunité cellulaire. En effet, certains paramètres tels que le pH, la température ou encore la richesse du milieu de culture influencent l'aspect morphologique que peut prendre *Candida albicans* (Sudbery, 2001) (Figure 12) :

- La forme blastospore, ronde ou ovale, mesurant de 2 à 4 µm avec parfois un bourgeon de formation ;
- La forme pseudomycélium, mesurant de 500 à 600 µm de longueur et de 3 à 5 µm de largeur, composée d'un assemblage de cellules mises bout à bout pour simuler un filament mycélien (Sudbery, 2001; Sudbery *et al.*, 2004). Chaque compartiment cellulaire est identique en longueur, contient la même quantité de matériel génétique, mais diffère du précédent en quantité de cytoplasme et de ces constituants (Barelle *et al.*, 2006).
- La forme mycélium vrai, champignon filamenteux, spécifique de l'espèce *Candida albicans*, ou la conversion d'une levure en filament mycélien passe par l'intermédiaire d'une structure appelée le tube germinatif. Cette forme favorise l'invasion des tissus et des organes de l'hôte (Anofel, 2007).

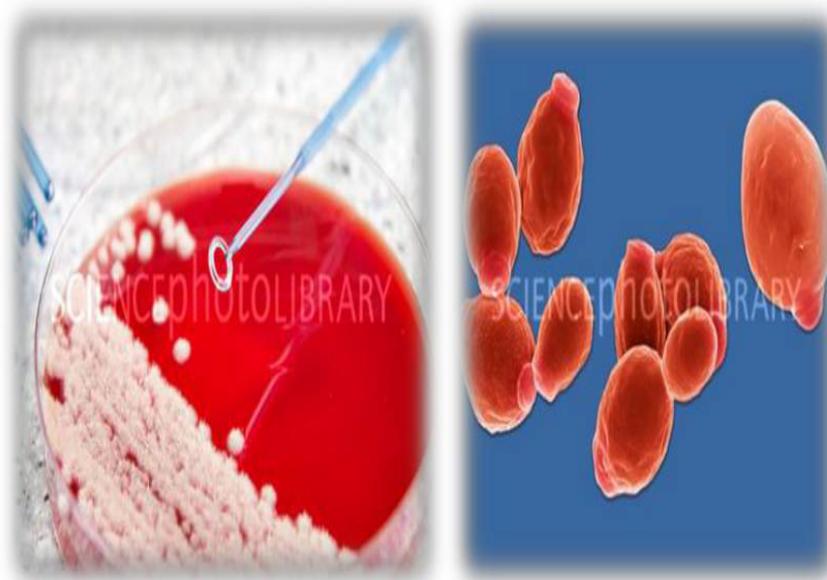


Figure 12 : *Candida albicans*

Culture sur milieu Schaedler agar et aspect microscopique (Beckmann et Flegler, 2017).

III-2.4. Pouvoir pathogène

Le genre *Candida* comprend environ 200 espèces dont les plus rencontrées en pathologie humaine sont : *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr* et *C. dubliniensis* (Fitzpatrick *et al.*, 2006).

L'épidémiologie des candidoses, aussi bien superficielles que profondes, a été marquée par une augmentation majeure de leur fréquence durant les 25 dernières années, liée en grande partie à l'accroissement du nombre des patients à risque. Chez l'Homme, les levures du genre *Candida* sont susceptibles de devenir pathogènes et d'envahir les tissus superficiels ou profonds sur certains terrains immunodéprimés comme chez les individus âgés, ou encore ceux traités par chimiothérapie, ou souffrant de désordre hématologique (HIV-positif leucémie), ou chez les sujets ayant un traitement antibiotique à large spectre ou un déséquilibre endocrinien (diabète, grossesse) (Eggiman *et al.*, 2003; Patterson, 2005). Le passage de l'état commensal à l'état pathogène est donc le plus souvent lié à une défaillance des systèmes de défense de l'hôte. *C. albicans* est capable de survivre comme commensal dans plusieurs sites anatomiques, chacun présentant ses propres pressions environnementales. Ceci explique les manifestations cliniques très diverses causées par ce champignon (Morgan, 2005; Tortorano *et al.*, 2006). Sur le plan clinique, il est habituel de distinguer les candidoses superficielles, invasives et allergiques.

III-3. *Aspergillus niger*

II-3.1. Habitat et répartition géographique

Dans la nature, les *Aspergillus* représentent entre 1 et 7% des champignons environnementaux. A cause de leur petite taille et de leur hydrophobicité, les conidies d'*Aspergillus* sont facilement mises en suspension dans l'air ; on les retrouve alors aussi bien dans la poussière que dans les systèmes de climatisation. En effet les concentrations de spores atteignent 1 à 100/m³ d'air à l'intérieur comme à l'extérieur. Les concentrations peuvent monter jusqu'à 109/m³ dans certains environnements comme les centres de compostage (Desoubeaux et Chandener, 2010). Les spores aspergillaires sont également très fréquentes dans les chantiers ou zones de travaux diverses. On les retrouve aussi sur les plantes (feuilles fleurs, fruits), la paille, le fourrage humide, les pots de fleurs, mais également à la surface des murs dans les locaux humides (murs recouverts de moisissures), sur les matériaux de démolition abandonnés à la pluie. L'inhalation de conidies pour chaque personne est alors constante et quotidienne. On estime qu'un individu inhale de 2000 à 5000 génotypes différents par mois, du fait de l'importante biodiversité des spores aspergillaires (Desoubeaux et Chandener, 2010). Concernant la survie des *Aspergillus* dans le milieu extérieur, elle est quasiment illimitée, car ces champignons sont essentiellement saprophytes. Leur résistance aux agents extérieurs est également importante. En effet, parmi les agents physiques, seules la dessiccation et la chaleur à 100°C peuvent tuer les spores. De plus, le froid ne les affecte pas.

II-3.2. Classification taxonomique

Règne	Fungi
Division	Ascomycota
Subdivision	Pezizomycotina
Classe	Eurotiomycetes
Ordre	Eurotiales
Famille	Aspergillaceae
Genre	<i>Aspergillus</i>
Espèce	<i>Aspergillus brasiliensis (niger)</i> (Varga <i>et al.</i> , 2007).

III-3.3. Morphologie

Caractères cultureux : Ce champignon pousse rapidement (2 à 3 jours) sur les milieux de culture classiques (géloses au malt et Sabouraud). La température optimale de croissance varie généralement entre 25 et 30°C, mais *A. niger* peut se développer jusqu'à 42°C.

Les colonies d'*A. niger* sont granuleuses, blanches au début, puis jaunes et, à maturité, elles deviennent noires. Le revers des colonies est incolore ou jaune pâle. Sur le milieu Czapek *A.niger* forme des colonies à mycélium blanc ou jaune, et revers souvent incolore (Tabuc, 2007).

Morphologie microscopique : Les têtes conidiennes, bisériées, radiées, sont disposées en plusieurs colonnes brunâtres ou noires. Les conidiophores sont longs atteignant 1,5 à 3 mm lisses, hyalins ou brunâtres dans leur moitié supérieure. Les vésicules sont globuleuses et entièrement fertiles. Les phialides (7 à 10 x 3 à 3,5 µm) sont portées par des métules brunâtres, de dimensions variables. Les conidies sont habituellement globuleuses, parfois légèrement aplaties. Elles mesurent 3,5 à 5 µm de diamètre, sont brunes, échinulées à très verruqueuses.

Les sclérotes parfois différenciés, sont crème à chamois foncé au début, puis virent au chamois vinacé (Figure 13).



Figure 13 : *Aspergillus niger*

Culture de 7 jours sur gélose au malt à 25°C et aspect microscopique (Tabuc, 2007).

III-3.4. Pouvoir pathogène

Certaines espèces d'*Aspergillus* sont des pathogènes opportunistes ; leur développement nécessite des conditions locales favorables (cavernes tuberculeuses, cancer bronchopulmonaire, broncho-pneumopathies chroniques obstructives, emphysèmes mucoviscidose...) ou générales (corticothérapies prolongées, hémopathies malignes chimiothérapies aplatissantes, SIDA...) (Badillet *et al.*, 1987 ; Morin, 1994).

Aspergillus niger fait partie des principales espèces responsables de mycoses (aspergilloses) rarement rencontré chez l'immunocompétent ; chez le sujet immunodéprimé il peut provoquer des aspergilloses, des otites et des sinusites ; il est aussi à l'origine d'infections cutanées, pulmonaires et généralisées (Morin, 1994) ; *Aspergillus niger* peut produire de l'acide oxalique, des malformines et, certaines souches, des aflatoxines (Botton *et al.*, 1990).

CHAPITRE IV : EVALUATION *IN VITRO* DE L'ACTIVITE ANTIFONGIQUE DES HUILES ESSENTIELLES

Les méthodes du laboratoire qui permettent d'estimer les propriétés d'un produit *in vitro* sont nombreuses, mais reposent toutes sur le même principe, celui de confronter la substance antimicrobienne (fongicide, bactéricide, insecticide,...) et l'agent pathogène (champignons bactéries, insectes,...) sur un support artificiel.

IV-1. Méthode de diffusion

IV-1.1. Méthode de diffusion par puits

Le principe de cette technique est semblable à la méthode des disques, mais ces derniers sont remplacés par des puits creusés stérilement sur la géloseensemencée. L'incubation des boîtes de Pétri à la température optimale de croissance du micro-organisme permet le développement des colonies. La formation d'un halo clair autour du puits indique l'absence de la croissance microbienne dont le diamètre dépend de la sensibilité à l'HE (Wan *et al.*, 1998).

IV-1.2. Méthode de diffusion par disques

La FDA (*Food and Drug Administration*) a approuvé cette méthode comme standard pour le comité national de laboratoire clinique (Tajkarimi *et al.*, 2010). Cette technique, fiable et reproductible, est souvent la plus utilisée pour l'évaluation de l'activité antibactérienne. Elle est semblable à l'antibiogramme qui permet de tester les antibiotiques. Elle constitue une étape préliminaire à des études plus approfondies car elle donne des résultats qualitatifs. Elle consiste à déposer un disque stérile, imbibé d'huile essentielle, sur la surface de géloseensemencée de bactérie tout au début de sa croissance, puis les géloses sont incubées dans les conditions optimales de température du microorganisme étudié pendant 24 à 48 heures.

L'obtention d'un halo clair autour du disque montre la zone où les microbes n'ont pas pu se développer. Le diamètre de la zone d'inhibition, qui dépend de la sensibilité à l'HE, est mesuré en mm traduisant l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle (Benkeblia, 2004 ; Hanif *et al.*, 2011).

Ces deux méthodes (des disques et des puits) sont largement employées pour l'indication qualitative de la sensibilité ou la résistance des micro-organismes. Des études plus approfondies seront nécessaires afin de pouvoir quantifier en termes de concentrations par les méthodes de dilution.

IV-1.3. Méthode de dilutions

La méthode de dilution consiste à faire une série de dilution d'une gamme de concentration en huile essentielle à laquelle une suspension microbienne est inoculée. Le but est de déterminer la concentration la plus faible de l'HE qui inhibe la croissance du microorganisme testé exprimée en $\mu\text{l/ml}$ ou mg/ml . Deux techniques peuvent être utilisées :

- La microdilution consiste à ensemercer, par un inoculum standardisé une gamme de concentration décroissante en huile essentielle. Après incubation l'observation de la gamme permet d'accéder à la concentration minimale inhibitrice (CMI), qui correspond à la plus faible concentration en huile essentielle capable d'inhiber la croissance de 90% de la population microbienne.

Une microdilution des huiles essentielles à tester, est produite dans une microplaque contenant 20 μl DMSO, de manière à générer une gamme de dilution de base 2. La gamme de concentration est alors produite dans les 96 puits. 20 μl de l'huile essentielle sont ajoutés dans le premier puits de chaque ligne à partir du quel est effectuée une dilution géométrique de base 2. Puis 160 μl de milieu Sabouraud liquide (BS) inoculé avec 20 μl d'une suspension de levures à 10^8 UFC.ml^{-1} sont ajoutés à chaque puits. Chaque ligne est réservée pour une souche déterminée, Des puits contenant de BS inoculés par la souche déterminée sont utilisés comme contrôles positifs, ceux contenant le DMSO et BS non inoculés sont utilisés comme contrôle négatif.

Après 48 heures d'incubation à 37°C , la CMI de l'huile essentielle est déduite à partir du premier puits de la gamme dépourvu de croissance microbienne (Eloff, 1998).

- La macrodilution qui utilise une série de tube à hémolyses ou des tubes à essais stériles. Cette méthode diffère de la précédente uniquement par la quantité de l'inoculum.

MATERIELS

ET

METHODES

Cette étude a été réalisée, conjointement, au sein du Laboratoire de Mycologie, Biotechnologie et de l'Activité Microbienne et au Laboratoire d'Obtention des Substances Thérapeutiques (UFMC1). Elle a duré de décembre 2017 à Mai 2018.

Pour réaliser ce travail, nous avons choisi de comparer l'activité antifongique de différents extraits obtenus de deux condiments de grande consommation qui sont l'ail et le gingembre à celle de deux médicaments antifongiques classiques, qui sont le fluconazole et l'amphotéricine B.

1- Matériel végétale

Les gousses d'*Allium sativum* et les rhizomes de *Zingiberis rhizoma* ont été achetés au niveau du marché (Ritaj Mall) pour en extraire leurs huiles essentielles. L'ail choisi est de culture algérienne, il provient de la commune d'El Harouche wilaya de Skikda. Le gingembre provient de l'importation, originaire d'Inde.

L'étude comparative a été effectuée sur l'HE obtenue par hydrodistillation et l'HE obtenue par extraction assistée par micro-ondes pour chacun des condiments (Figure 14), avec les principes actifs des médicaments qui ont été extraits selon les méthodes décrites dans les pharmacopées.



Figure 14 : Photographies des gousses d'ail et de rhizomes de gingembre utilisés dans notre étude

2- Souches fongiques

Les deux souches fongiques utilisées font partie de la collection ATCC. Elles nous ont été fournies gracieusement par le Laboratoire National de Contrôle des Produits Pharmaceutiques Constantine. Il s'agit d'*Aspergillus niger* ATCC 16404 et de *Candida albicans* ATCC 10231, de la marque KWIK-STIK™.

La préparation de la suspension fongique stock de longue conservation a été réalisée de la manière suivante :

Les souches lyophilisées ont été reconstituées par hydratation du lyophilisat avec le fluide hydratant fourni avec le système (Mode d'emploi KWIK-STIK™). A partir de cette suspension, deux boîtes de gélose Sabouraud – CMP ont été inoculées. Après incubation de trois jours à 35°C pour *C. albicans* et sept jours à 37°C pour *A.niger*, la confirmation de la pureté des souches a été réalisée suivie de la préparation des suspensions stocks (Normes Françaises NF EN 12353, 2013).

- Pour *Candida albicans* : dix millilitres de la solution cryoprotectrice à 15% de glycérol (Annexe 1) ont été déversées à la surface d'une des deux boîtes de gélose Sabouraud – CMP préalablementensemencées et les colonies ont été récupérées aseptiquement en grattant la surface à l'aide d'un petit râteau en verre. La suspension a été récupérée à l'aide d'une seringue stérile, puis mise en incubation pendant deux jours à 35°C.

- Pour *Aspergillus niger* : dix millilitres de la solution cryoprotectrice à 15% de glycérol ont été déversées à la surface d'une des deux boîtes de gélose Sabouraud – CMP préalablementensemencées et les spores ont été récupérées aseptiquement en grattant la surface à l'aide d'une anse de platine stérile, puis mise en incubation durant cinq jours à 37°C.

Les suspensions ont été réparties à raison de 0,5ml par cryotube, puis conservé à -18°C.

3- Techniques d'extraction des huiles essentielles

3-1- Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation

L'extraction des huiles essentielles a été réalisée au laboratoire N°02 de la Faculté SNV de l'Université Frères Mentouri Constantine 1. Elle a été effectuée par hydrodistillation à l'aide d'un Clevenger.

La récupération de l'HE par solvant organique a été réalisée au Laboratoire de Biochimie, de la même faculté et la même université.

700g de gousses d'ail frais (*Allium sativum*) ont été nettoyées, épluchées et coupées en petits morceaux puis introduits dans un ballon de deux litres et enfin immergés dans un litre d'eau distillée. L'extraction a duré trois heures.

L'extraction par Clevenger a été répétée trois fois dans les mêmes conditions. L'HE a été récupérée dans de l'éther diéthylique puis séchée par ROTAVAP (Figure 15).

Concernant les rhizomes de gingembre frais (*Zingiberis rhizoma*), ces derniers ont été lavés à l'eau de robinet, épluchés et râpés puis introduites dans un ballon de deux litres et enfin immergées dans un litre d'eau distillée. L'extraction a duré trois heures.

L'extraction par Clevenger a été répétée trois fois dans les mêmes conditions, 958g de rhizome ont été utilisés. L'HE a été récupérée dans de l'éther diéthylique puis séchée par ROTAVAP (Figure 15).



Figure 15: Photographies prises lors de l'extraction de l'ail et gingembre par hydrodistillation au Laboratoire N°2, suivie d'une récupération liquide – liquide au Laboratoire de Biochimie (Faculté SNV, Université Frères Mentouri Constantine1).

3-2-Extraction des huiles essentielles par extraction sans solvant assistée par micro-ondes

L'extraction sans solvant assistée par micro-ondes (SFME) a été réalisée au sein du Laboratoire d'Obtention des Substances Thérapeutiques (LOST), Département de chimie, Université Frères Mentouri Constantine 1.

L'huile de 200g de gousses d'ail frais a été extraite à l'aide d'un appareil à micro-ondes de marque NEOS. Les conditions opératoires étaient les suivantes : pression 200 Watt, température jusqu'à 102°C, le temps d'extraction 30 minutes.

200g de rhizomes de gingembre frais ont été utilisés et l'HE a été extraite grâce à un appareil à micro-ondes de marque NEOS. Les conditions opératoires étaient les suivantes : pression 200 Watt, température jusqu'à 104°C, le temps d'extraction 40 minutes (Figure 16).



Figure 16 : Photographies prises lors de l'extraction de l'ail et gingembre par technique SFME au laboratoire LOST, Université Frères Mentouri Constantine 1.

Le rendement en HE a été calculé pour les deux condiments. Tous les extraits ont été stockés à 4°C dans des flacons bruns et à l'abri de la lumière jusqu'au moment de leurs utilisation.

3-2-1- Détermination des rendements en huiles essentielles

Le rendement est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue et la masse du matériel végétal utilisé pour cent (AFNOR, 2000). Après récupération des huiles essentielles, le rendement est exprimé en pourcentage (%) et calculé par la formule suivante (Selvakumar *et al.*, 2012) :

$$\text{RHE}\% = \frac{M_h}{M_v} \times 100$$

RHE = Rendement en Huile Essentielle en %.

M_h = Masse d'huiles essentielles récupérées en gramme (g) = poids plein du flacon – poids vide du flacon.

M_v = Masse du matériel végétal en gramme (g).

4- Activité antifongique

Les méthodes qui permettent d'estimer les propriétés d'un produit *in vitro* reposent sur le principe de confronter la substance antimicrobienne (fongicide, bactéricide, insecticide,...) et l'agent pathogène (champignons, bactéries, insectes,...) sur un support artificiel.

La méthode qui a été choisie pour déterminer l'activité antifongique des HE sur nos deux souches fongiques est la méthode de diffusion sur milieu solide dite technique de *Vincent* (Daroui-Mokaddem, 2012). Le principe de cette méthode est basé sur la migration de l'HE par diffusion dans la gélose qui s'inspire de l'antibiogramme et a été généralisée aux HE. On utilise soit des disques de papier filtre de 10 mm de diamètre imprégnés d'HE et déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé en surface, ou en créant des puits à l'emporte pièce dans la gélose coulée et solidifiée en boîte. On remplit ces cavités par un volume donné d'HE qui va diffuser dans la gélose. Après incubation, on mesure de diamètre d'inhibition.

La technique par diffusion est aussi décrite par la pharmacopée Européenne, dont le principe consiste à ensemencer le milieu de culture à une température de 48°C à 50°C avec une quantité déterminée de la suspension calibrée de microorganismes. Le milieu est coulé immédiatement en couche uniforme de 2 à 5mm d'épaisseur dans des boîtes de Pétri. Le milieu peut – être constitué de 2 couches, seule la couche supérieure étant ensemencée (Ek *et al.*, 2014).

4-1- Mise en évidence de la pureté des souches fongiques

Pour la confirmation de l'identité de nos deux souches fongiques, qui sont déjà référencées, une observation microscopique à l'objectif $\times 40$ et un aspect macroscopique des colonies sur milieux de culture ont été réalisées.

4-2- Détermination de la concentration de l'inoculum par turbidimétrie

Le trouble d'une suspension microbienne (bactéries, levures, spores) est proportionnel au nombre de cellules présentes dans la suspension. Certes cette technique ne distingue pas les cellules mortes des cellules vivantes, mais son intérêt principal est sa rapidité et sa facilité d'application. La mesure est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre à l'absorbance mesurée entre 500 et 650 nm (El-Kirat-Chatel, 2010).

L'inoculum de *Candida albicans* doit correspondre à une concentration de 1 à 5×10^6 UFC/ml selon la norme National Committee for Clinical Standard, *NCCLS* (ancien nom pour Clinical and Laboratory Standard Institutes *CLSI*).

La suspension de levure a été préparée dans de l'eau physiologique stérile à 8,5‰ (Michael *et al.*, 2002) (Annexe 2), puis a été calibrée à une densité optique de $DO_{625nm} = 0,08$ à 0,1 qui correspond à 1 à 5×10^6 UFC/ml (Michael *et al.*, 2002).

L'inoculum d'*Aspergillus niger* doit correspondre à une concentration de 0,4 à 5×10^4 UFC/ml (Espinell-Ingroff *et al.*, 2009). La suspension sporale a été préparée dans de l'eau physiologique stérile, puis a été calibrée à une densité optique de $DO_{530nm} = 0,09$ à 0,11 qui correspond à 0,4 à 5×10^4 UFC/ml (Espinell-Ingroff *et al.*, 2009).

La suspension calibrée de *C. albicans* a été préparée à partir d'une culture jeune de 24 heures en eau physiologique stérile à 8,5‰, puis ajustée à $DO_{625nm} = 0,1$. La suspension sporale calibrée de *A. niger* a été préparée à partir d'une culture sporulée de 7 jours en eau physiologique stérile puis ajustée à $DO_{530nm} = 0,094$, à l'aide d'un colorimètre de marque LIBRA S6+.

4-3- Préparations des témoins

Des témoins positifs ont été réalisés pour prouver la sensibilité de nos deux souches fongiques et pour pouvoir effectuer une étude comparative entre l'activité de nos extraits et celle des antifongiques classiques. Pour cela on a utilisé deux médicaments antifongiques qui sont le fluconazole (Flucazole®), gélules à 150 mg et l'Amphotéricine B (Fungizone®), suspension buvable à 10%.

Une gélule de Flucazole® à était dissoute dans 1ml de méthanol afin d'en extraire le principe actif (Ek *et al.*, 2014).

Un millilitre de Fungizone® a était dissoute dans 1ml de DMSO, afin d'en extraire le principe actif et conservé à l'abri de la lumière (Ek *et al.*, 2014).

On a testé également le méthanol (Saffidine, 2015) et le DMSO (Ek *et al.*, 2014) ayant servi à dissoudre les principes actifs de nos antifongiques classiques comme témoins négatifs.

4-4- Conditions opératoires

Une diffusion en double couche a été réalisée pour déterminer l'activité antifongique sur *C. albicans*. Le milieu utilisé est la gélose Muller – Hinton (Rex *et al.*, 2009). La première couche a été d'environ 4 mm d'épaisseur de gélose MH stérile (soit 15ml), la deuxième a été inoculée à raison de 2% de la suspension calibrée et coulée à raison de 5ml par boîte de Pétri. Des puits de 6mm de diamètre ont été réalisés au centre de chaque boîte de Pétri à l'aide d'un emporte pièce en verre stérile.

Les concentrations de 25µl, 50µl, 75µl et 100µl ont été déposées dans chaque puits pour chaque HE. Il en est de même pour les témoins positifs. L'essai a été répété trois fois pour chaque essai.

Le choix de ces concentrations a été adopté suite aux essais préliminaires qui ont permis d'éliminer les concentrations de 5µl, 10µl et 20µl.

Les boîtes ont été incubées 48 heures à 35°C (Sheehan *et al.*, 2004). L'action de l'antifongique se manifeste par la formation d'une auréole d'inhibition autour du puits.

Le diamètre de la zone d'inhibition est ensuite mesuré à l'aide d'un pied à coulisse (Figure 17).

Pour *Aspergillus niger*, une diffusion en simple couche a été réalisée pour déterminer l'activité antifongique. Le milieu utilisé est la gélose SAB – CMP, qui a étéensemencé à raison de 2% de la suspension sporale calibrée, puis couler à raison de 15ml par boîte de Pétri (Ek *et al.*, 2014).

Des puits de 10mm de diamètres ont été réalisés au centre de chaque boîte de Pétri à l'aide d'un emporte pièce stérile.

Les concentrations de 75 µl, 100 µl et 125µl ont été introduites dans chaque puits pour chaque huile essentielle, témoins positifs. L'essai a été répété trois fois pour chaque essai.

Il est à noter que le choix des concentrations est justifié comme indiqué précédemment. En parallèle, nous avons utilisé des témoins afin de vérifier la bonne croissance des deux souches sur leurs milieux respectifs.

Les boîtes ont été incubées 48 heures à 35°C (Sheehan *et al.*, 2004). L'action de l'antifongique se manifeste de la même manière que celle décrite précédemment.

Pour chaque puits, on a mesuré avec précision le diamètre de la zone d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse.

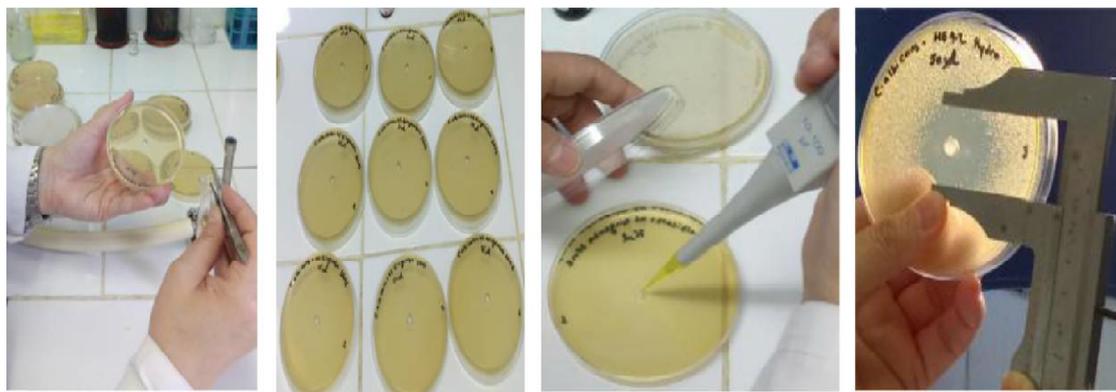


Figure 17 : Photographies prises lors de la réalisation des essais antifongique.

4-5- Détermination de la concentration minimale d’Inhibition (CMI) par la méthode de diffusion sur gélose

Les extraits ayant montré une activité antifongique positive, sont sélectionnés pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) par la méthode de diffusion sur gélose. La CMI d’un extrait vis-à-vis d’une souche donnée correspond à la plus petite des concentrations montrant une zone d’inhibition visible à l’œil nu.

Des concentrations successives de 25 μ l, 50 μ l, 75 μ l et 100 μ l d’HE ont été utilisé pour déterminer la CMI de *C. albicans*, et celles de 75 μ l, 100 μ l et 125 μ l d’HE ont été utilisé pour déterminer la CMI d’*A.niger*.

4-6- Détermination de la Concentration Minimale Fongicide (CMF)

La CMF a été définie comme étant la plus faible concentration d’antifongique qui détruit 99,9% de l’inoculum fongique, ce qui correspond dans notre étude à un dénombrement inférieur à 10² UFC/ml pour *C. albicans* et à 1 UFC/ml pour *A. niger*, après 48 heures d’incubation (l’inoculum initial étalé étant de 10⁵ UFC/ml pour *C.albicans* et 10³ UFC/ml pour *A. niger*) (Daroui-Mokaddem, 2012).

**RESULTATS
ET
DISCUSSIONS**

1- Calcul du rendement en HE

La formule suivante a été utilisée pour calculer les rendements :

$$\text{RHE}\% = \frac{\text{Mh}}{\text{Mv}} \times 100$$

RHE = Rendement en **H**uile **E**ssentielle en %.

Mh = Masse d'**h**uiles essentielles récupérées en gramme (**g**) = poids plein du flacon – poids vide du flacon.

Mv = Masse du matériel **v**égétal en gramme (**g**).

L'extraction des huiles essentielle à partir des gousses d'ail par hydrodistillation et par SFME nous a permis d'obtenir des rendements respectifs de 2,80% et 3,77%. En ce qui concerne l'HE extraite à partir des rhizomes du gingembre par hydrodistillation et par SFME nous avons obtenu les rendements respectifs de 0,58% et 1,47% (Tableau 2).

Tableau 2 : Rendements des HE obtenues

HE	Ail		Gingembre	
	Hydrodistillation	SFME	Hydrodistillation	SFME
Mv (g)	700	200	958	200
Mh (g)	19,62	7,55	5,58	2,94
RHE %	2,80	3,77	0,58	1,47

Nous constatons, de manière générale, que les rendements en huiles obtenus à partir de l'*Allium sativum* sont relativement meilleurs que ceux obtenus pour le *Zingiberis rhizoma*. Par ailleurs, il en ressort que le rendement en HE obtenu par SFME est plus important que celui obtenu par hydrodistillation. En effet, à poids de matière fraîche égal (200g) pour les deux plantes, le rendement par SFME est 4,5 fois plus important que par hydrodistillation pour l'ail et 12 fois plus grand dans le cas du gingembre (Figure 18).

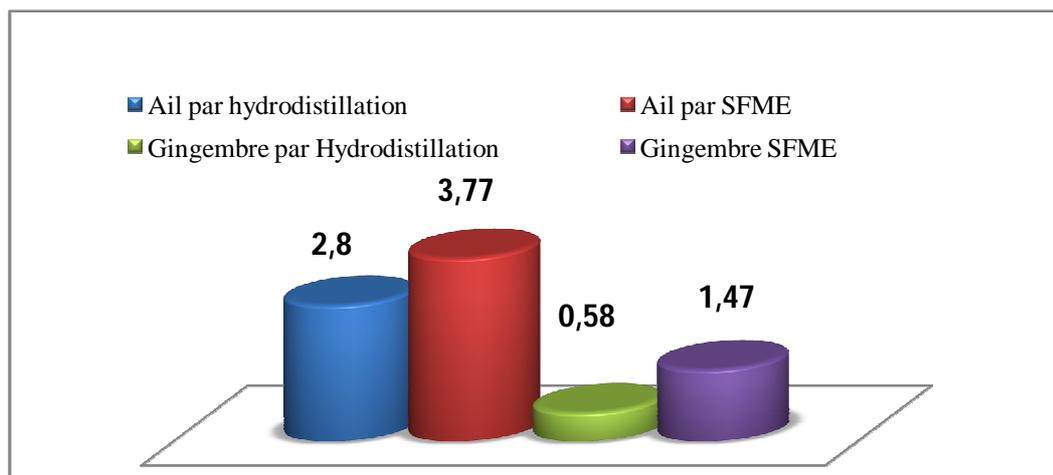


Figure 18 : Rendement en huile essentielle extrait par hydrodistillation et SFME pour les plantes investiguées.

Cette variabilité entre les deux plantes étudiées est due probablement à la composition et la consistance de chaque plante, ainsi que le degré de maturité des plantes lors de la cueillette, les conditions de culture et de cueillettes, les conditions et la durée de stockage. Par ailleurs, il est à noter que la quantité de lipides contenus dans l'ail méditerranéen est d'environ 49% (Zouari Chekki *et al.*, 2014) alors que le gingembre n'en contient que 10%.

De plus, il est important de signaler que les gousses d'ail sont des produits locaux et qui ont été acheté en pleine saison, alors que le gingembre est un produit importé et dont la période et les conditions de stockage ne sont pas connues.

2- Activité antifongique

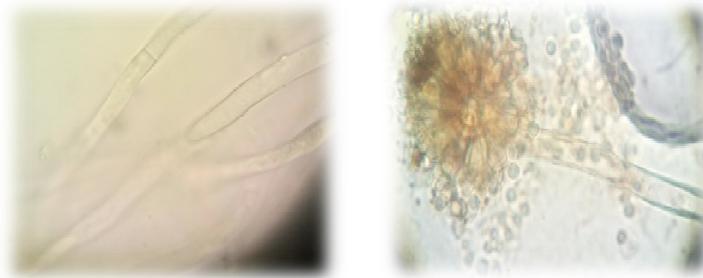
2-1- Confirmation de la pureté des souches fongiques

➤ *Aspergillus niger* l'aspect macroscopique des colonies d'une culture de 7 jours sur gélose SAB – CMP à 35°C a démontré des colonies d'abord blanches, puis jaunes et enfin granuleuses noires en surface, et un revers incolore à jaune pâle (Figure 19). L'observation microscopique a démontrée un mycélium septé, une tête aspergillaire bisériée radiée, une vésicule globuleuse, des phialides insérées sur la vésicule grâce a des métules, un conidiophore lisse, hyalin long et des conidies globuleuses, échinulées dispersées ou en chaîne (Figure 20).



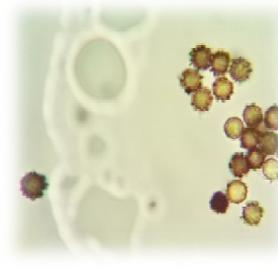
Face

Revers

Figure 19 : Photographies d'une culture de 7 jours d'*A.niger*, sur gélose SAB-CMP

Mycélium septé

Tête aspergillaire

Vésicule globulaire,
métules et phialides

Spores échinulées

Figure 20 : Observation microscopique d'*A.niger* à l'objectif $\times 40$

➤ *Candida albicans* : l'aspect macroscopique des colonies d'une culture de 48 heures sur gélose SAB – CMP à 35°C a démontré des colonies blanches, crémeuses, lisse (Figure 21). L'observation microscopique a démontré des levures ovoïdes, dont certaines présentent un bourgeonnement unilatéral (Figure 22).

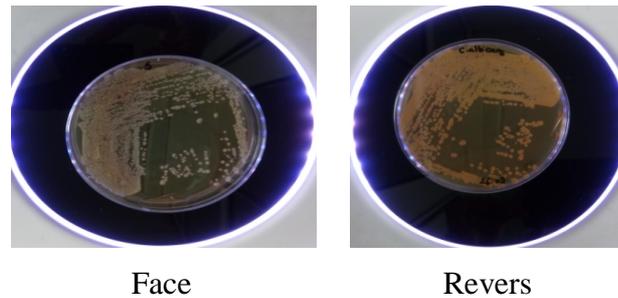


Figure 21 : Photographie d'une culture de 48 heures de *C. albicans*, sur gélose Sabouraud-CMP (identification macroscopique)

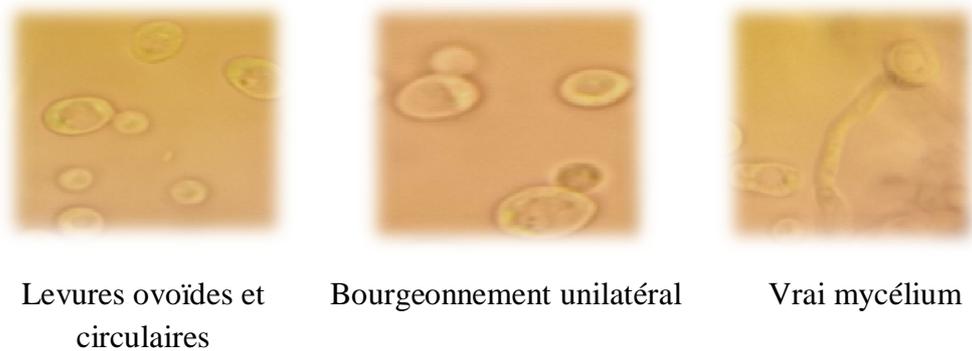


Figure 22 : Observation microscopique de *C. albicans* à l'objectif $\times 40$

2-2- Détermination de l'activité antifongique des HE

La méthode de diffusion des puits (technique de *Vincent*) nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antifongique des HE obtenus et des médicaments vis-à-vis des deux souches fongiques étudiées. Les résultats obtenus sont résumés dans les tableaux et figures ci-dessous.

2-2-1-Effets sur *C. albicans*

Les tableaux de 3 à 8 résument les zones d'inhibitions mesurées en millimètres (mm) après 48 heures d'incubation, en utilisant un pied à coulisse.

Les figures de 23 à 30 illustrent les différents résultats obtenus et ont été prises après 48 heures d'incubation à 35°C.

C. albicans + HE d'ail extraite par hydrodistillation

L'HE de l'*Allium sativum* extraite par hydrodistillation, qui montre une activité fongistatique aux faibles concentrations de 25 μ l et 50 μ l sur *C. albicans*.

Tableau 3 : Zones d'inhibition (mm), en présence de différentes concentrations d'HE d'ail extrait par hydrodistillation, de l'espèce *C. albicans*.

Répétitions [HE ail]	1	2	3	Moyenne
25µl	21,1	21,6	17,2	19,97
50µl	26,2	29,0	27,2	27,47
75µl	IPT ^①			70 ^②
100µl	IT ^③			90

① IPT : Inhibition Presque Totale. A 75 µl la population a été réduite de **99,89%** (UFC/boite = $135 + 120 + 84 / 3 = 1,13 \times 10^2$ UFC).

② La moyenne des zones d'inhibition mesuré = 70mm (70 + 60 + 80 / 3)

③ IT : Inhibition Totale. La moyenne des zones d'inhibition est voisine de 90mm.

L'extrait testé a montré une activité fongicide à la concentration de 75µl puisqu'il a réduit la population de **99,89%**, qui peut être définie comme la CMF. A 100µl d'HE nous n'observons aucune croissance de *C. albicans*.

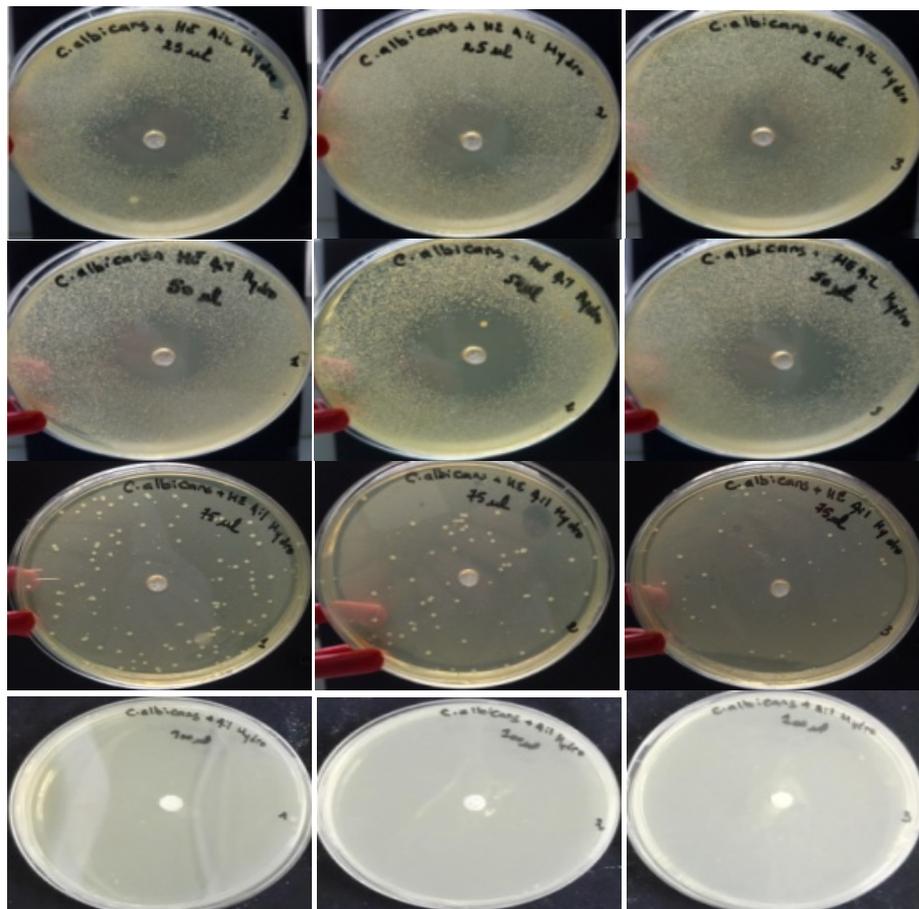


Figure 23: Résultats de l'activité antifongique des différentes concentrations de l'HE d'ail extraite par hydrodistillation sur *C. albicans*.

C. albicans + HE d'ail extraite par SFME

L'HE de l'*Allium sativum* extrait par SFME, qui montre une activité fongistatique aux concentrations de 50 μ l et 75 μ l sur *C.albicans*, alors que la concentration de 25 μ l n'a eu aucun effet sur la levure (Tableau ci-dessous). On peut déduire que 50 μ l est la CMI.

Tableau 4 : Zones d'inhibition (mm), en présence de différentes concentrations d'HE d'ail extraite par SFME, de l'espèce *C. albicans*.

Répétitions [HE ail]	1	2	3	Moyenne
25 μ l	00	00	00	00
50 μ l	11,4	11,0	12,0	11,47
75 μ l	15,2	14,0	16,2	15,13
100 μ l	IPT ^①			89 ^②

① à 100 μ l la population a été réduite de **99,90%** (UFC/boîte = $19 + 4 + 265 / 3 = 0,96 \times 10^2$ UFC).

② La moyenne des zones d'inhibition mesurées = 89mm (89 + 90 + 88 / 3).

L'activité fongicide débute à la concentration de 100 μ l puisque la population a été réduite de **99,90%**. Ainsi 100 μ l est la CMF.

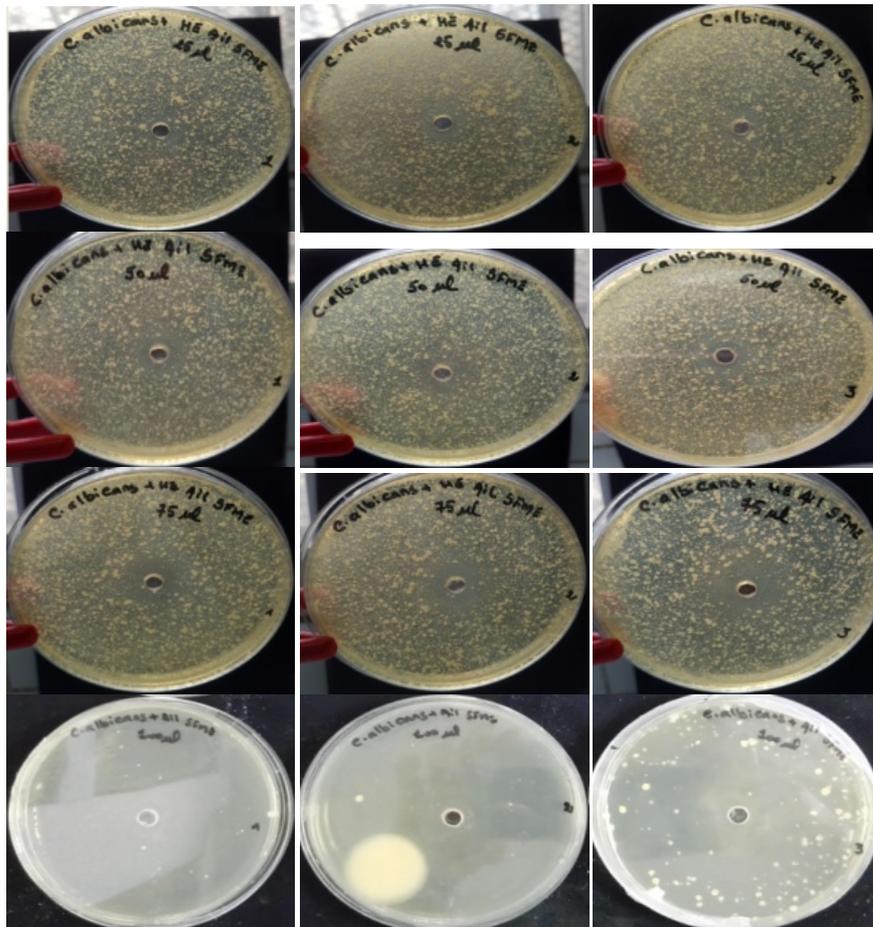


Figure 24 : Résultats de l'activité antifongique des différentes concentrations de l'HE d'ail extraite par SFME sur *C. albicans*.

C. albicans + HE de gingembre extraite par hydrodistillation

L'HE du *Zingiberis rhizoma* extrait par hydrodistillation montre une activité fongistatique aux concentrations de 50 μ l et 75 μ l, alors que la concentration de 25 μ l n'a eu aucun effet sur *C.albicans* (Tableau 5). La CMI correspond à 50 μ l.

Tableau 5 : Zones d'inhibition (mm), en présence de différentes concentrations d'HE de gingembre extrait par hydrodistillation, de l'espèce *C. albicans*.

Répétitions [HE gingembre]	1	2	3	Moyenne
25 μ l	00	00	00	00
50 μ l	11,8	10,2	10,4	10,8
75 μ l	12,0	11,8	13,6	12,47
100 μ l	IPT ^①			89,6^②

① à 100 μ l la population a été réduite de **99,96%** (UFC/boite = $7 + 5 + 81 / 3 = 0,31 \times 10^2$ UFC).

②La moyenne des zones d'inhibition mesurés = 89mm (89,9 + 89 + 89,9 / 3).

L'activité fongicide débute à la concentration de 100 μ l puisque la population a été réduite de **99,96%**, et donc c'est la CMF (Figure 25).

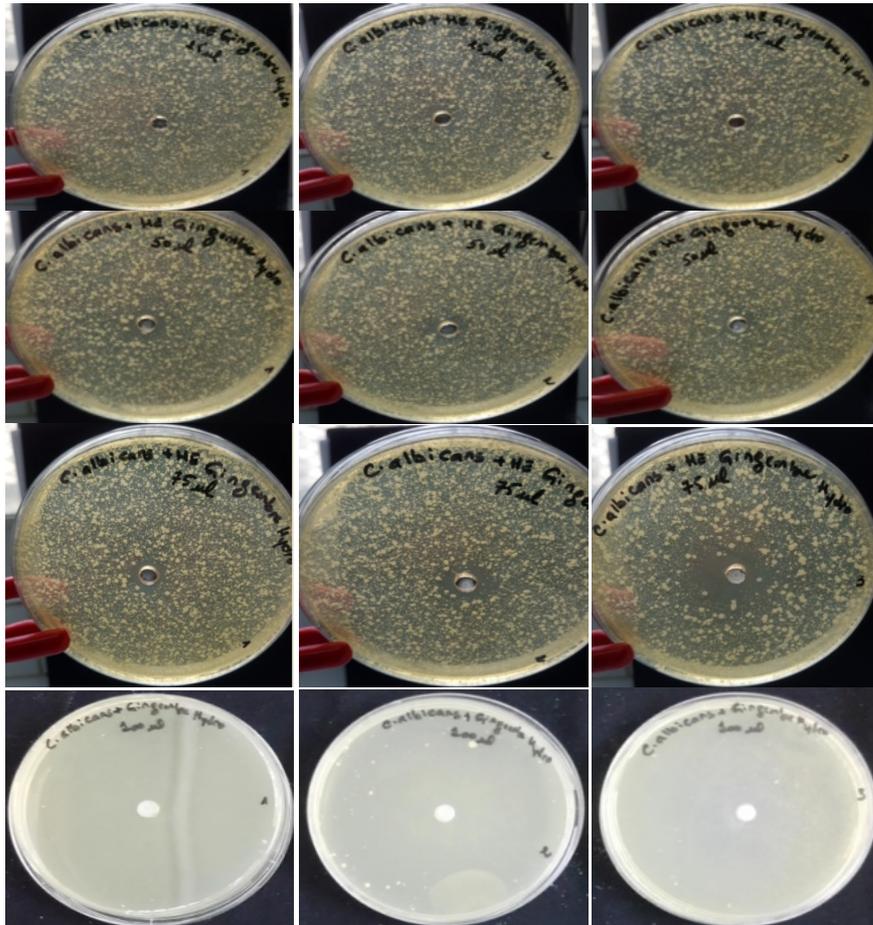


Figure 25 : Résultats de l'activité antifongique des différentes concentrations de l'HE de gingembre par hydrodistillation sur *C. albicans*.

C. albicans + HE gingembre extrait par SFME

L'HE de gingembre extrait par SFME commence à donner des zones d'inhibitions à partir de la concentration de 100 μ l, ce qui nous permet de dire que c'est la CMI. Les résultats sont illustrés par le tableau 6 et la figure 26.

Tableau 6 : Zones d'inhibition (mm), en présence de différentes concentrations d'HE de gingembre extrait par SFME, sur l'espèce *C. albicans*.

Répétitions [HE gingembre]	1	2	3	Moyenne
25 μ l		AI [ⓐ]		NA
50 μ l		AI		NA
75 μ l		AI		NA
100 μ l	36,0	15,0	22,0	24,33

ⓐ AI : Absence d'inhibition.

A 100 μ l la population a été la suivante (UFC/boîte / boîte 1 = 27 colonies, boîte 2 > 300 colonies et la boîte 3 = 133 colonies).

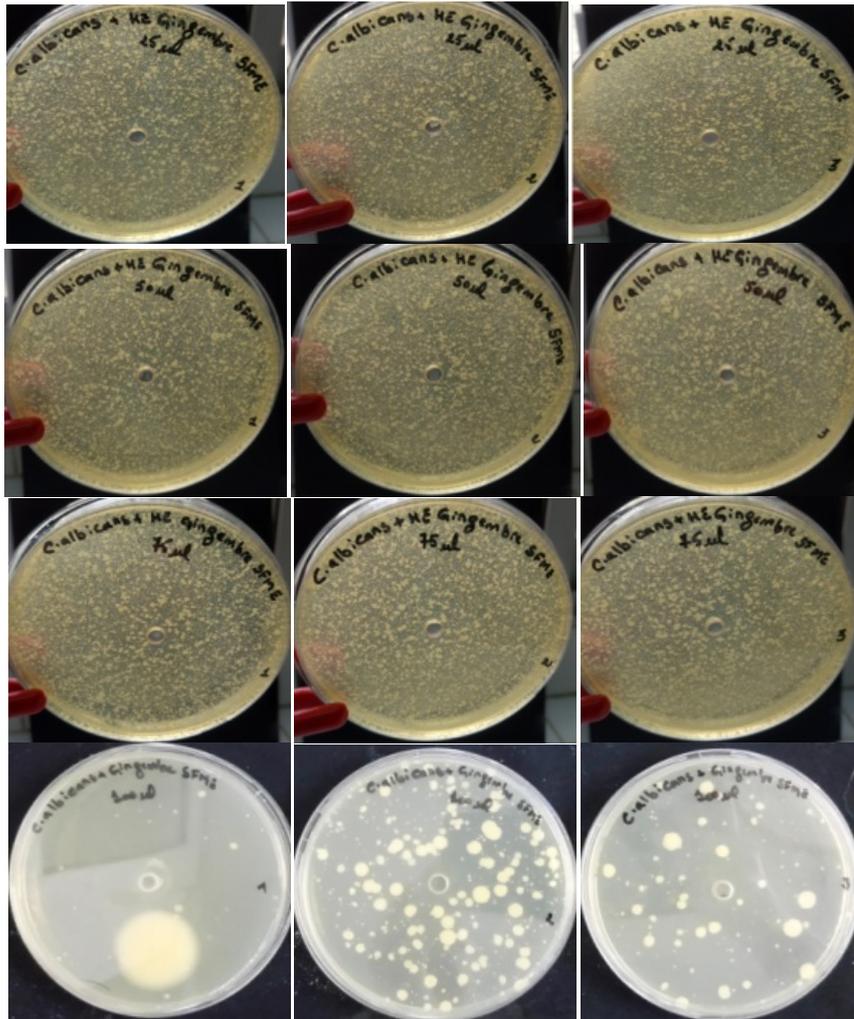


Figure 26 : Résultats de l'activité antifongique des différentes concentrations de l'HE de gingembre par SFME sur *C. albicans*.

***C. albicans* + Témoin positif « Fluconazole »**

Toutes les concentrations du fluconazole ont montré une action fongicide sur *C. albicans*. Cela est démontré par le tableau 7 et la figure 25.

Tableau 7 : Zones d'inhibition (mm), en présence de différentes concentrations de Fluconazole à 150mg, de la souche *C.albicans*.

Répétitions [Fluconazole]	1	2	3	Moyenne
25µl	IT			90
50µl	IT			90
75µl	IT			90

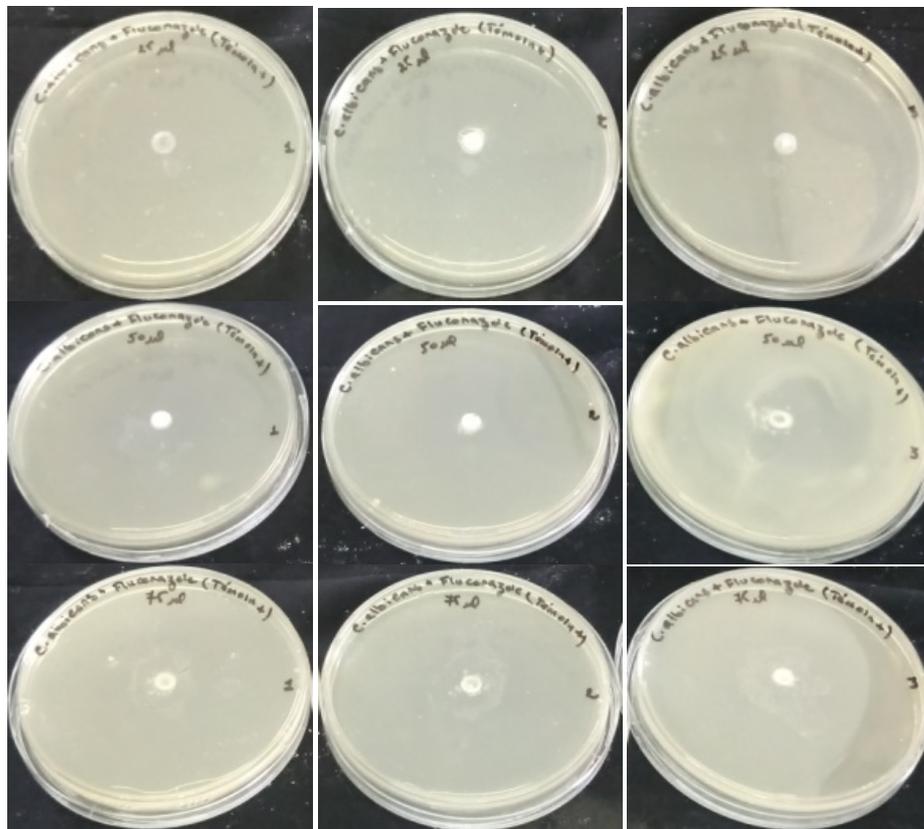


Figure 27 : Résultats de l'activité antifongique des différentes concentrations du témoin positif Fluconazole à 150mg sur *C. albicans*

***C. albicans* + Témoin positif « Amphotéricine B »**

Toutes les concentrations de l'amphotéricine B ont montré des zones d'inhibition à diamètre progressif par rapport aux différentes concentrations testées 25,50 et 75µl (Tableau 8 et Figure 28).

Tableau 8 : Zones d'inhibition (mm), en présence de différentes concentrations d'Amphotéricine B à 10%, sur la souche *C. albicans*.

Répétitions [Ampho B]	1	2	3	Moyenne
25µl	25,0	29,0	39,0	31,0
50µl	29,0	32,0	33,0	31,3
75µl	41,0	41,0	33,0	38,3

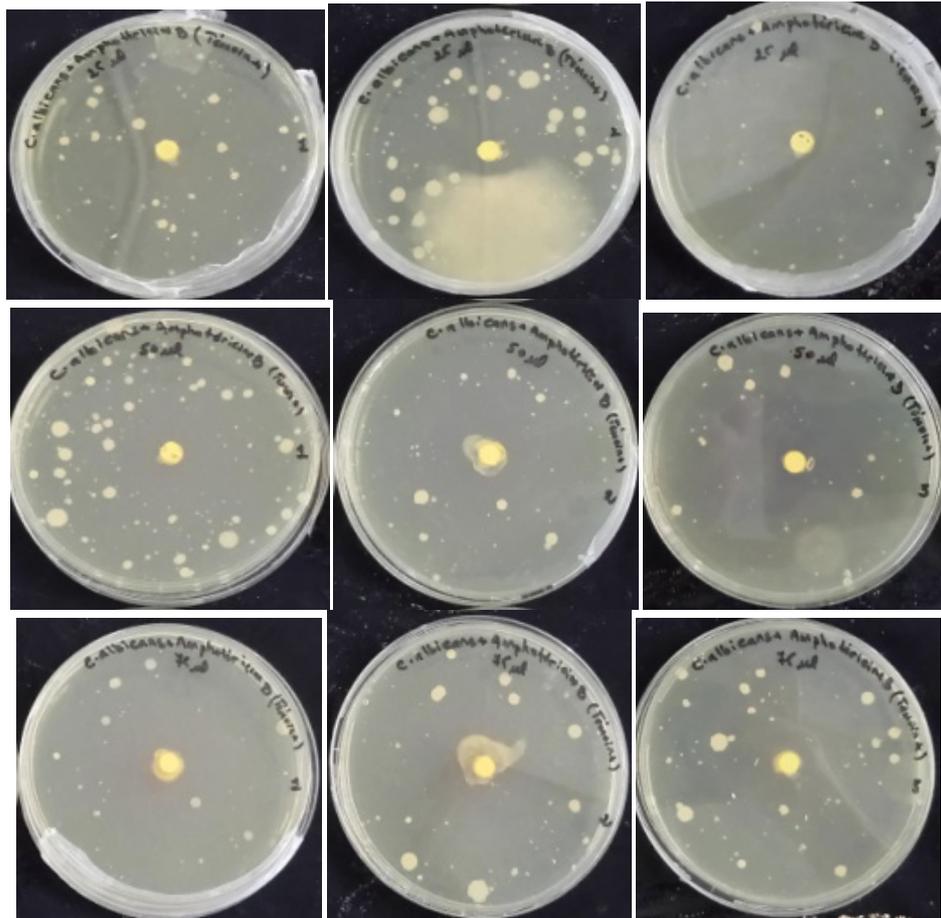


Figure 28 : Résultats de l'activité antifongique des différentes concentrations du témoin positif Amphotéricine B à 10% sur *C. albicans*.

C. albicans + Témoins négatifs

Les diluants utilisés n'ont eu aucun effet sur *C. albicans*, puisqu'elle y'a une croissance normalement et d'une manière uniforme (Figure 29).

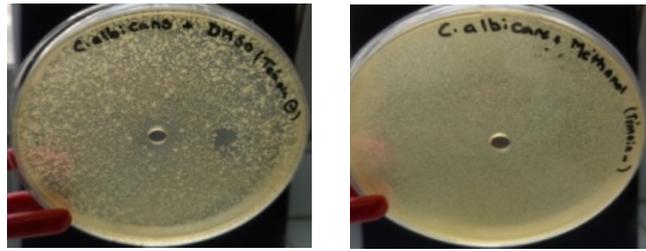


Figure 29 : Résultats de l'activité antifongique des témoins négatifs (DMSO et Méthanol).

D'après les résultats obtenus, nous constatons que les quatre huiles essentielles ont eu un effet significatif sur *Candida albicans*, puisque nous avons obtenu :

- Une CMI à 25µl et une CMF à 75µl, avec un effet létal total à 100µl pour l'HE d'ail extrait par hydrodistillation (CMF/CMI = 3)
- Une CMI à 50µl et une CMF à 100µl pour l'HE d'ail extrait par SFME (CMF/CMI = 2)
- Une CMI à 50µl et une CMF à 100µl pour l'HE de gingembre extrait par hydrodistillation (CMF/CMI = 2)
- Une CMI à 100µl pour l'HE de gingembre extrait par SFME.

Le fluconazole a eu un effet fongicide à 100% pour toutes les concentrations testées, alors que nous avons obtenu une CMI ≤ 25µl pour l'amphotéricine B. Les résultats obtenus sont illustrés par l'histogramme comparatif ci-dessous :

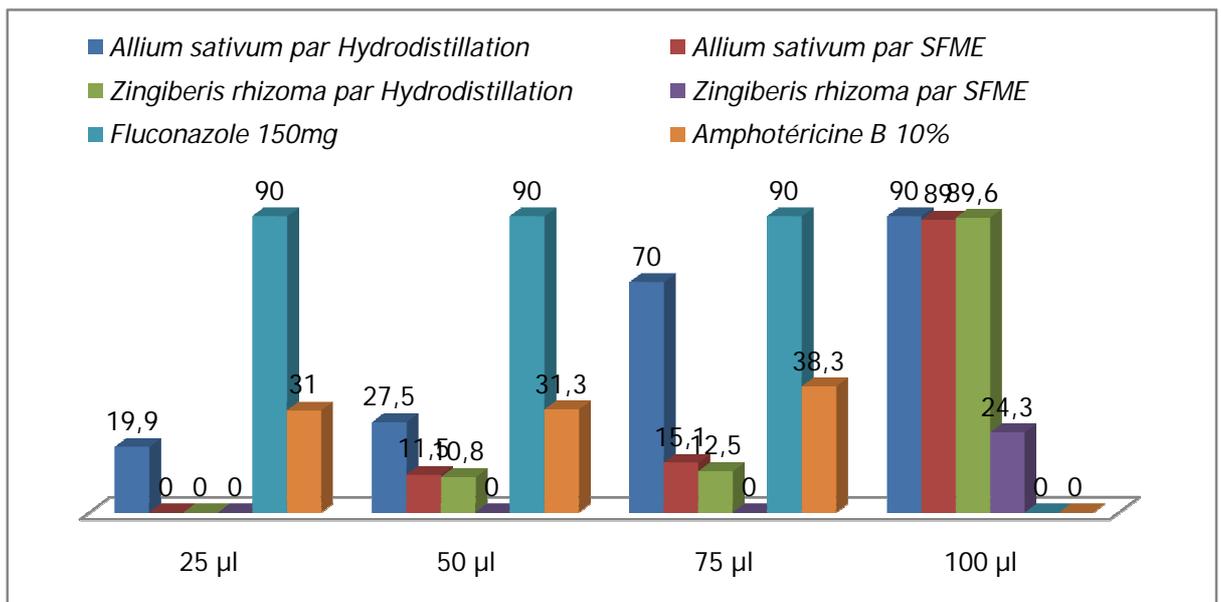


Figure 30 : Effets des différents extraits testés sur *C.albicans*

2-2-2- Effets sur *A.niger*

Les tableaux de 9 à 14 résument les zones d'inhibitions mesurées en millimètres (mm) après 72 heures d'incubation, en utilisant un pied à coulisse. Les figures de 30 à 38 illustrent les différents résultats obtenus et ont été prises après 72 heures d'incubation à 35°C.

A.niger + HE d'ail extraite par hydrodistillation

L'HE de l'*Allium sativum* extraite par hydrodistillation montre une activité fongicide à la concentration de 75µl puisqu'elle a réduit la population de 99,97% et aux concentrations plus fortes (100 et 125µl) il n'y a plus aucune croissance. On peut, de ce fait, déduire que 75µl est la CMF.

Tableau 9 : Zones d'inhibition (mm), en présence de différentes concentrations d'HE d'ail extraite par hydrodistillation, de l'espèce *A. niger*.

Répétitions [HE ail]	1	2	3	Moyenne
75µl	IPT ^①			89,7 ^②
100µl	IT			90
125µl	IT			90

① à 75 µl la population a été réduite de 99,97% (UFC/boite = $1 + 4 + 3 / 3 = 0,26 \times 10$ UFC).

② La moyenne des zones d'inhibition mesurées = 89,7mm (89,6 + 89,9 + 89,6 / 3).

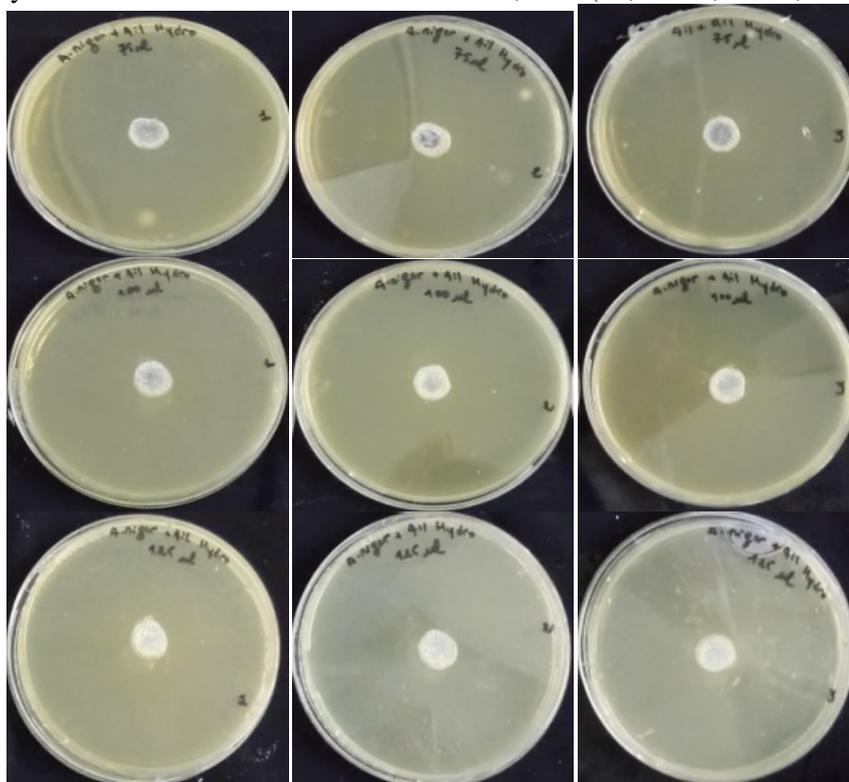


Figure 31 : Résultats de l'activité antifongique des différentes concentrations de l'HE d'ail extrait par hydrodistillation sur *A. niger*.

***A.niger* + HE d'ail extraite par SFME**

L'HE de l'ail extrait par SFME n'a montré aucune activité sur *A. niger* aux différentes concentrations (Tableau 10).

Tableau 10 : Zones d'inhibition (mm), en présence de différentes concentrations d'HE d'ail extraite par SFME, sur l'espèce *A. niger*.

Répétitions [HE ail]	1	2	3	Moyenne
75µl		AI		00
100µl		AI		00
125µl		AI		00

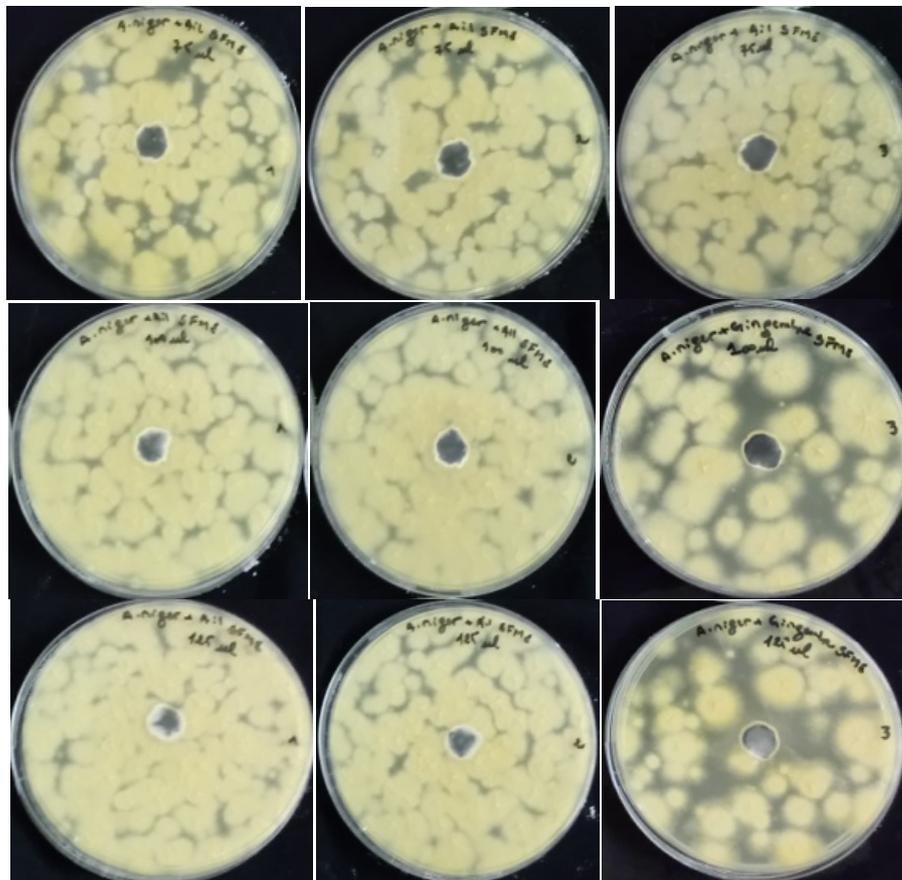


Figure 32 : Résultats de l'activité antifongique des différentes concentrations de l'HE d'ail extraite par SFME sur *A. niger*.

***A.niger* + HE gingembre extraite par hydrodistillation**

L'action de l'HE du gingembre extrait par hydrodistillation est presque similaire à celle de l'ail extrait par hydrodistillation, sauf que pour le premier l'action fongicide est au dessous des 75µl (Tableau ci-dessous).

Tableau 11 : Zones d'inhibition (mm) en présence de différentes concentrations d'HE de gingembre extraite par hydrodistillation, de l'espèce *A. niger*.

Répétitions [HE gingembre]	1	2	3	Moyenne
75µl		IT		90
100µl		IT		90
125µl		IT		90

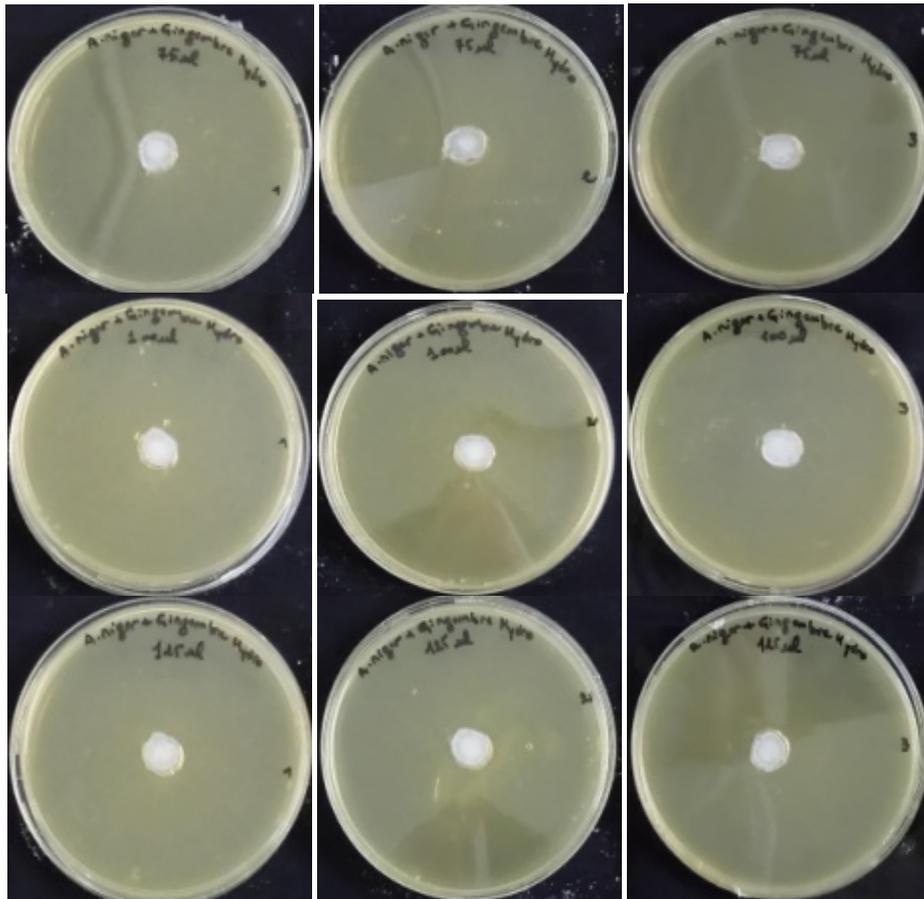


Figure 33 : Résultats de l'activité antifongique des différentes concentrations de l'HE de gingembre extrait par hydrodistillation sur *A. niger*.

A. niger + HE gingembre extraite par SFME

L'action de l'HE du gingembre extrait par SFME est similaire à celle de l'ail extrait par SFME qui n'ont montré aucune activité sur *A. niger* aux différentes concentrations. Néanmoins nous observons une diminution de la croissance par rapport aux témoins négatifs, comme le démontre les photos représentées dans la figure 35.

Tableau 12 : Zones d'inhibition (mm), en présence de différentes concentrations d'HE de gingembre extraite par SFME, de l'espèce *A. niger*.

Répétitions [HE gingembre]	1	2	3	Moyenne
75µl		AI		NA
100µl		AI		NA
125µl		AI		NA

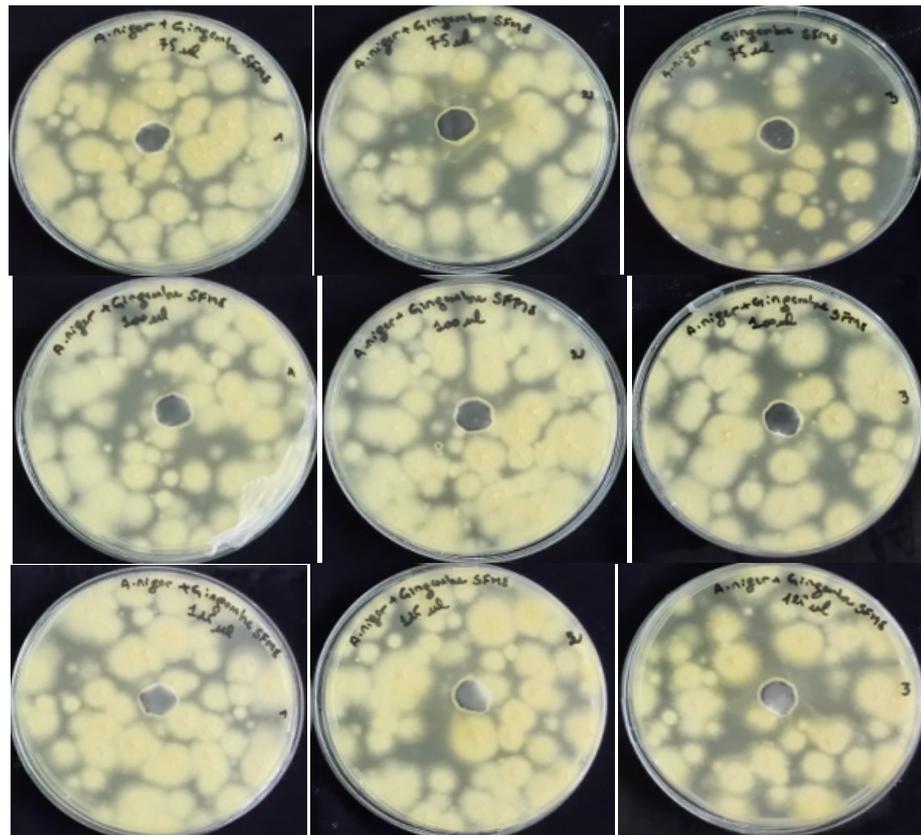


Figure 34 : Résultats de l'activité antifongique des différentes concentrations de l'HE de gingembre extrait par SFME.

A. niger + Témoin positif « Fluconazole »

Le fluconazole a inhibé la croissance d'*A. niger* de manière anti-progressive, puisque la plus forte concentration a donnée la plus petite zone d'inhibition (125µl → 16mm) et inversement 75µl → 18,3 mm. Ce qui est démontré dans le tableau 14 et la figure 35.

Tableau 13 : Zones d'inhibition (mm), en présence de différentes concentrations de Fluconazole à 150mg, sur *A. niger*.

Répétitions [Fluconazole]	1	2	3	Moyenne
75µl	19,0	17,0	19,0	18,3
100µl	17,0	17,0	18,0	17,3
125µl	17,0	16,0	15,0	16,0

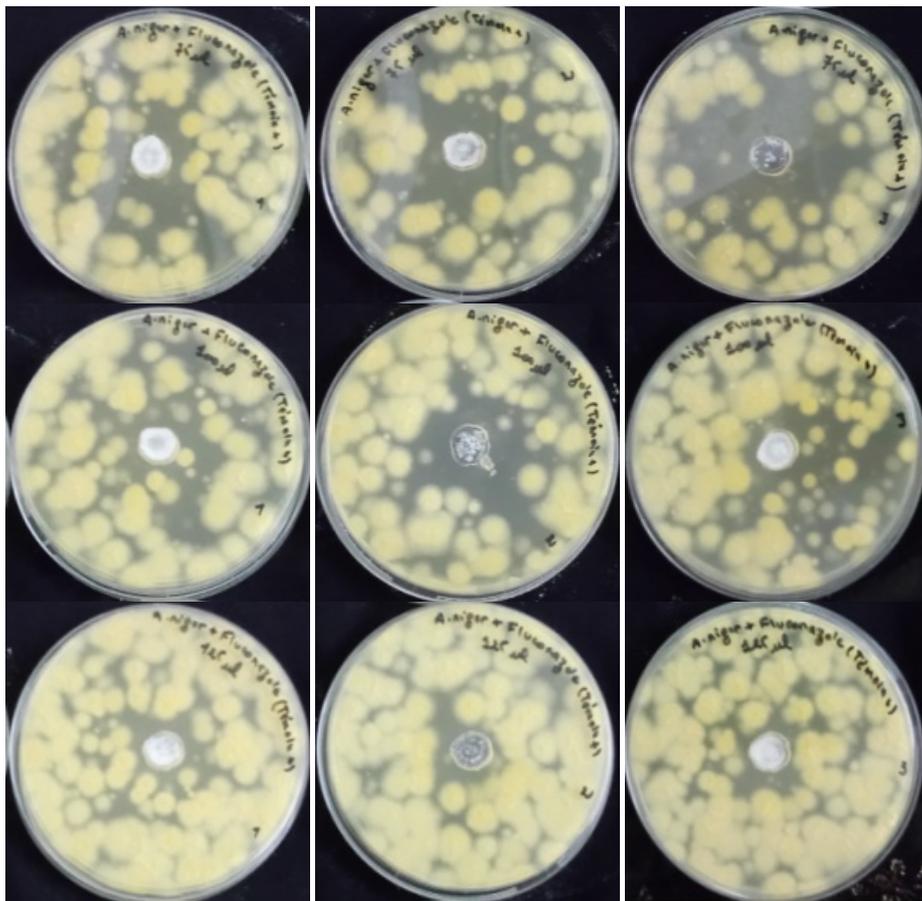


Figure 35 : Résultats de l'activité antifongique des différentes concentrations du témoin positif Fluconazole à 150mg sur *A.niger*.

A.niger + Témoin positif « Amphotéricine B »

L'Amphotéricine B a inhibé la croissance d'*A.niger* de meilleure façon avec les faibles concentrations (Tableau 15 et Figure 36).

Tableau 14 : Zones d'inhibition (mm), en présence de différentes concentrations d'Amphotéricine B à 10%, sur *A.niger*.

Répétitions [Ampho B]	1	2	3	Moyenne
75µl	22,0	24,0	23,0	23,0
100µl	21,0	28,0	21,0	23,3
125µl	18,0	18,0	18,0	18,0

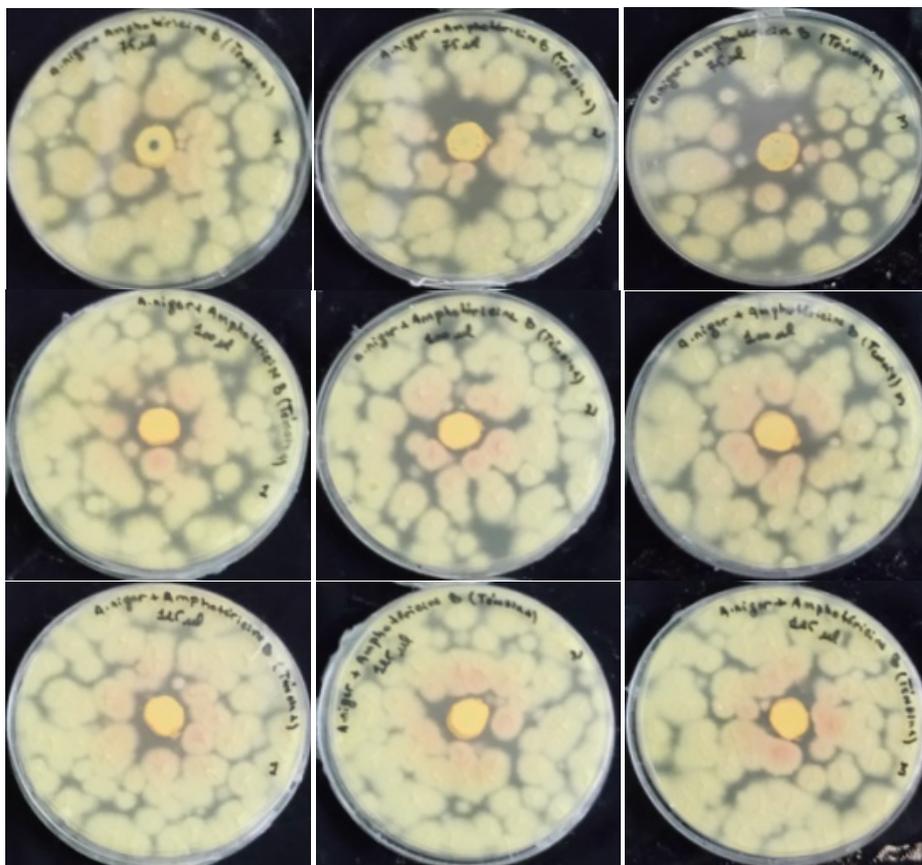


Figure 36 : Résultats de l'activité antifongique des différentes concentrations du témoin positif Amphotéricine B à 10% sur *A. niger*.

A.niger + Témoins négatifs

Les témoins négatifs (Figure ci-dessous) n'ont pas eu d'action sur *A.niger*.



Figure 37 : Résultats de l'activité antifongique des témoins négatifs (DMSO et Méthanol).

Les résultats obtenus nous révèlent que les deux huiles extraites par hydrodistillation de l'ail et du gingembre ont eu un effet très significatif sur *Aspergillus niger* :

- Une CMI à 75µl et un effet létal total pour les concentrations supérieures, pour d'ail extrait par hydrodistillation ;
- Un effet fongicide total pour toutes les concentrations de l'HE de gingembre extrait par hydrodistillation ;

Par contre, nous n'observons aucun effet pour les deux huiles extraites par SFME.

Les deux médicaments antifongiques ont eu un effet similaire, puisque nous constatons une CMI ≤ 75µl pour les deux antifongiques classiques. Les résultats obtenus précédemment nous permettent de tracer l'histogramme comparatif ci-dessous :

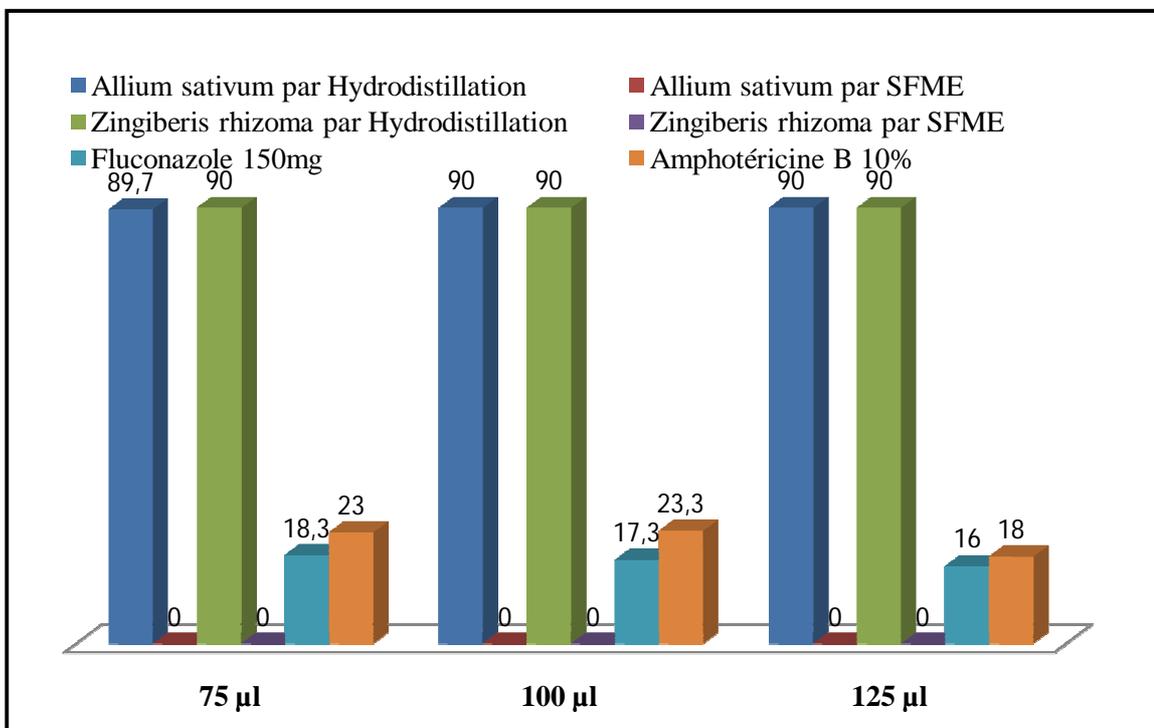


Figure 38 : Effets des différents testés sur *A.niger*

3- Discussion générale

Les résultats obtenus dans cette étude montrent que le rendement en huiles essentielles, obtenu par hydrodistillation, d'*Allium sativum* est nettement plus important (2,8 %) que celui obtenu par d'autres auteurs (0,09%) sur le même condiment d'une région mitoyenne qui est la commune d'El Harouche (Khadri, 2009).

Concernant *Zingiberis rhizoma*, notre rendement en HE par SFME (1,47%) est 12 fois supérieur à celui obtenu par hydrodistillation (0,58). Divers facteurs tels que l'espèce, la période de récolte, l'âge de la plante, la partie soumise à la distillation et la technique d'extraction peuvent influencer ce rendement. C'est ce qui a été prouvé par les travaux de Zrira et Benjlali en 1991 et en 1992.

L'évaluation de l'activité antifongique par la méthode de diffusion sur gélose, nous a donnée des diamètres d'inhibition très variables selon l'HE utilisée et la souche à tester. Les HE sont considérées comme actives si elles produisent des diamètres d'inhibition de croissance microbienne supérieurs ou égaux à 15 mm selon Rossi *et al.* (2007).

Pour *Candida albicans* tous les diamètres d'inhibition sont supérieurs à 15 mm. Les HE d'*Allium sativum* et *Zingiberis rhizoma* ont fortement inhibé la croissance de cette souche. Ce résultat est en corrélation avec les travaux de Benmeddour *et al.* (2015) sur l'ail. Cette levure s'est révélée, également, sensible à d'autres HE, notamment, celle de *Mentha rotundifolia* et *Majorana hortensis* Chebaibi *et al.* (2015).

Concernant l'espèce *Aspergillus niger*, cette dernière s'est révélée extrêmement sensible à l'HE des deux condiments extraite par hydrodistillation. Nos résultats sont similaires à ceux obtenus par Reyhan et Mihriban (2007) sur la même plante. En revanche, cette souche s'est montrée résistante aux HE d'autres condiments, tel que le piment (*Capsicum*) Wagner (1993). Il en est de même pour nos extraits obtenus par SFME.

Par ailleurs, il est à noter que concernant l'activité antifongique, Bercher *et al.* (1991) et Éberlin (1994) révèlent que lorsque le rapport CMF/CMI d'une substance est inférieur ou égal à quatre (≤ 4), cette substance est jugée fongicide tandis qu'elle est dite fongistatique si ce rapport est supérieur à quatre (> 4).

Dans notre étude, les rapports CMF/CMI pour *Candida albicans* de l'HE d'*Allium sativum* par hydrodistillation est égal à trois ($=3$), alors qu'il est égale à deux ($= 2$) par

SFME. Pour le *Zingiberis rhizoma* par hydrodistillation le rapport est égal à deux (= 2). Toutes les HE ont eu un effet fongicide sur *C.albicans*.

Alors que pour *Aspergillus niger* ce rapport CMF/CMI n'a pas pu être calculé par manque de données. Soit c'est la CMF qui manque ou c'est la CMI. Néanmoins, on peut constater que les deux HE extraite par hydrodistillation des deux condiments étudiés ont eu un effet au minimum fongistatique pour la première, puisqu'elle a donné une CMF à 75µl et un effet létal total pour les concentrations supérieurs (100µl et 125µl). Et un effet fongicide pour la deuxième, puisqu'il y a eu une inhibition totale de la croissance à toutes les concentrations.

Quant aux fongicides de synthèse, ils ont eu un effet sur *C. albicans*, puisque le fluconazole a eu un effet létal à toutes les concentrations étudiées et l'amphotéricine a montré des diamètres d'inhibitions voisins de 30mm pour les trois concentrations.

Le fluconazole et l'amphotéricine ont eu un effet similaire sur *A.niger*, puisque nous avons noté des diamètres d'inhibitions respectifs d'environ 17mm et 23mm.

Enfin, la comparaison de l'activité antifongique entre nos HE et les médicaments classiques sur la croissance des souches fongiques testées, nous a permis de constater un effet plus prononcé des HE étudiées par rapport à l'amphotéricine B et le fluconazole, exception faite pour les HE obtenues par SFME qui n'ont eu aucun effet sur *A.niger*.

**CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES**

Beaucoup de scientifiques ont effectué des recherches sur les HE pour leur trouver des activités pharmaco-biologiques, allant du traitement des coliques infantiles à l'utilisation en thérapie anticancéreuse en passant par les utilisations antimicrobienne, anti-inflammatoire et antalgique. Ainsi, les HE extraites de certaines plantes ont prouvé, leur valeur inestimable pour la santé. Il faut savoir que l'action des HE est souvent puissante et nécessite qu'elles soient utilisées de manière appropriée.

L'objectif initial de notre travail était de comparer l'activité antifongique de deux médicaments de synthèse à ceux des HE d'ail et de gingembre vis à vis de deux souches fongiques responsables de diverses infections mycosiques, qui sont *Candida albicans* et *Aspergillus niger*, et cela afin de trouver des alternatives aux remèdes chimiques dont l'efficacité reste limitée et surtout pour contrer le phénomène de résistance des microorganismes.

Après les extractions effectuées, il en ressort que le rendement en HE obtenu par SFME est plus significatif, puisqu'il est de 4,5 fois plus important que par hydrodistillation pour l'ail et 12 fois plus grand dans le cas du gingembre. Mais de manière générale les rendements en HE obtenus à partir de l'ail sont relativement meilleurs que ceux obtenus pour le gingembre.

L'activité antifongique des huiles essentielles et des médicaments de synthèses, testé par la méthode de diffusion sur gélose, la détermination de la CMI sur milieu gélosé et de la CMF révèlent que :

- L'HE d'*Allium sativum* extraite par hydrodistillation a une action déterminante sur *C.albicans*, avec une CMI à 25µl et une CMF à 75µl où la population a été réduite de 99,89%. Par SFME on constate une CMI à 50µl et une réduction de la population de 99,90% pour une CMF à 100µl. Sur *A.niger* l'HE d'ail obtenue par hydrodistillation montre une CMF à 75µl où la population a été diminuée de 99,97%, mais n'a aucune action n'a été observé pour l'HE extraite par SFME.
- L'HE du *Zingiber rhizoma* a une activité antifongique sur *C.albicans* avec une CMI à 50µl et une CMF à 100µl. Le taux de mortalité est égal à 99,96%, lorsqu'elle a été extraite par hydrodistillation, et une CMI à 100µl pour l'HE extraite par SFME. Sur *A.niger*, elle a un effet léthal à toutes les concentrations pour l'HE obtenue par hydrodistillation, mais aucun effet pour l'HE obtenue par SFME.

- Le fluconazole a eu un effet létal total sur *C.albicans* à toutes les concentrations, alors qu'on a constaté une CMI $\leq 75\mu\text{l}$ sur *A.niger*.
- L'Amphotéricine B a réagit de manière similaire sur les deux souches fongiques avec des CMI $\leq 75\%$.

Nous pouvons déduire de ce travail, que nos huiles essentielles ont un effet plutôt fongicide sur les souches testées. Cet effet, s'est avéré meilleur que celui des deux médicaments testés.

Au terme de notre étude, les résultats positifs nous encouragent à envisager les perspectives suivantes :

- Confirmer les résultats que nous avons obtenus pour l'HE de gingembre obtenu par SFME ;
- Réaliser une identification des composées des HE obtenues par les deux méthodes par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM) ;
- Elargir la gamme des plantes ayant une activité antifongique ;
- Essayer d'autres techniques d'extraction des plantes étudiées ;
- Tester les HE étudiées sur d'autres souches fongiques d'intérêt médical.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- AFNOR. (2000). Huiles essentielles, échantillonnage et méthodes d'analyse monographies relatives aux huiles essentielles (Tome 2).
- 2- Anofel. (2007). Association française des enseignants de parasitologie et mycologie. Parasitoses et mycoses des régions tempérées et tropicales. Edition Elsevier- Masson, Paris. Page 142.
- 3- Anofel. (2014). Association française des enseignants de parasitologie et mycologie. Parasitoses et mycoses des régions tempérées et tropicales. Edition Elsevier- Masson, Paris. 347 - 350.
- 4- Badillet G., de Bièvre C. et Guého E. (1987), Champignons contaminants des cultures, champignons opportunistes. Atlas clinique et biologique. Volume II. Edition VARIA, Paris. Page 183.
- 5- Barelle C.J., Richard M.L., Gaillardin C., Gow N.A and Brown A.J. (2006). *Candida albicans* VAC8 is required for vacuolar inheritance and normal hyphal branching. Eukaryot. Cell. 5. 359 - 367.
- 6- Beaudy L. (2008). La vaginite jamais plus solution et remèdes. Edition LANORE François-Xavier Sorlot, Paris. Page 17.
- 7- Beckmann D., Flegler S. (2017). Visuals Unlimited, Inc. /Science photo library. [En ligne]. https://www.sciencephoto.com/search?subtype=keywords&searchstring=candida+albicans+medium&sort_results=&per_page=20&page. [Consulté le 20/03/2018].
- 8- Belkhouja, H. (2016). Effet des biomolécules extraites à partir de différentes plantes de la région de Mascara : Evaluation biochimique des marqueurs d'ostéoarticulation et de l'activité biologique. Thèse de doctorat LMD éme cycle en Sciences Biologiques, option : Sciences, Technologie et Santé. Université de Mustapha Stambouli – Mascara. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie - Département de Biologie, Laboratoire de Bioconversion, Génie-microbiologie et Sécurité Sanitaire. 29, 33.
- 9- Benkeblia, N. (2004). Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). LWT - Food Science and Technology, 37 (2). 263 - 268.

- 10- Benmeddour T., Laouar H., Benabdi A.A. and Brahimi S. (2015). Evaluation of antibacterial and antifungal activity of extracts from three species of the genus *Allium*: *a. Cepa*, *fistulosum* and *sativum* grown in agricultural area of doussen. wilaya of Biskra. *Courrier du Savoir*. 09-14.
- 11- Berche P., Gaillard J.L., Simonet M. (1991). *Les bactéries des infections humaines*. Éditeur Flammarion, Médecine et Sciences. Page 660.
- 12- Berkhout, De Schimmelgesl. *Monilia*, *Oidium*, *Oospora* en *Torula*, *Disset*. Utrecht: 44 (1923). [En ligne] <https://mycomap.com/taxonomy/172889-candida-albicans>. [Consulté le 05/03/2018].
- 13- Bodey G.P., Mardani M., Hanna H.A., Boktour M., Abbas J., Girgawy E., Hachem Buffo J., Herman M.A. et Soll D.R. (1984). A characterization of pH-regulated dimorphism in *Candida albicans*. *Mycopathologia*. 21, 30, 85.
- 14- Botton B., Breton A., Fèvre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y. et Veau P. (1990), *Moisissures utiles et nuisibles, Importance industrielle*, Edition Masson, Paris. Page 275.
- 15- Chebaibi A., Marouf Z. F., Rhazi-Filali F., Fahim M. et Ed-Dra A. (2015). Évaluation du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de sept plantes médicinales récoltées au Maroc. Lavoisier SAS. DOI 10.1007/s10298-015-0996-1. *Phytothérapie* département de biologie. , Université Moulay Ismail Meknès, Maroc. 2-9.
- 16- Chemat F., Abert-Vian M. and Fernandez X. (2013). Chapter 3 : Microwave Assisted Extraction of Essential Oils and Aromas *in* *Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds. Theory and practice*. Edition Springer. 60-62.
- 17- Chu W.S., Magee B.B et Magee P.T. (1993). Construction of an SfiI macrorestriction map of the *Candida albicans* genome. *J. Bacteriol*. 175. 6637 - 6651.
- 18- Daroui-Mokaddem H. (2012). Etude phytochimique et biologique des espèces *eucalyptus globulus* (*myrtaceae*), *smyrnium olusatrum* (*apiaceae*), *asteriscus maritimus* et *chrysanthemum trifurcatum* (*asterarceae*).Thèse de doctorat en biochimie appliquée. Faculté de science. Université Badji Mokhtar, Annaba. 19-20, 60, 62.

- 19- Desoubeaux G. et Chandener J. (2010) *Aspergillus* et maladies aspergillaires. Feuilles De Biologie, 51, N°293. Page 11.
- 20- Duval L. (2012). Les Huiles Essentielles à l'officine. Thèse pour l'obtention de diplôme d'état en pharmacie. Université UFR de médecine et de pharmacie de Rouen. 65, 67.
- 21- Dzoyem J.P., Tangmouo J.G., Manfouo J.R., Lonsi D., Etoa F. X. et Lohouc P.J. (2006). Activité antifongique des extraits de quelques plantes médicinales Camerounaises. Nig. J. Nat. Prod. And Med. Vol. 10. Page 48.
- 22- Éberlin T. (1994). Les antibiotiques Classification, mode d'action, utilisation thérapeutique. Nathan, Paris. Page 88.
- 23- Eggimann P., Garbino J and Pittet D. (2003). Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet. Infect. Dis.* 3. 685, 702.
- 24- Ek M. et al. (2014). Pharmacopée Européenne 8^{ème} édition. Tome 1. Edition DEQM conseil de l'Europe. 246, 801, 1689, 2424.
- 25- El-Kirat-Chatel S. (2010). Développement d'outils cellulaires et moléculaires pour l'étude des interactions *Candida*-phagocytes ; Application à la caractérisation du gène OLE2 codant une désaturase chez *C.lusitaniae*. Thèse de doctorat, Option : Microbiologie, université de Bordeaux 2, France. 76-77.
- 26- Eloff J.N. (1998). A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica.* 3, 64, 711.
- 27- Espinel-Ingroff A., Canton E. and Peman J. (2009). Updates in Antifungal Susceptibility Medicine Group LLC ISSN 1936-3761. Page 134.
- 28- Farhat A. (2010). Vapo-Diffusion assistée par micro-ondes : Conception, Optimisation et application. Thèse de doctorat en sciences de l'université d'Avignon et des Pays de Vaucluse & l'Ecole Nationale d'ingénieurs de Gabès, spécialité en science des procédés, sciences des aliments. 19-21.

- 29- Fitzpatrick D.A., Logue M.E., Stajich J.E and Butler G. (2006). A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from super tree and combined gene analysis. *BMC.Evol. Biol.* 6. Page 99.
- 30- Franchomme P., Jollois R., Péroël D. (2001). L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation des huiles essentielles : Fondements, démonstration, illustration et applications d'une science médicale naturelle. Edition Roger Jollois. 3-54, 57 et 60.
- 31- Ghestem A., Seguin E., Paris M. et Orecchioni A.M. (2001). Paris, France. Le préparateur en pharmacie. Dossier 2 : Botanique – Pharmacognosie – Phytothérapie – Homéopathie. Edition TEC & DOC. 47, 101, 206, 207, 220.
- 32- Gerbeaud.com. [en ligne] .<http://www.gerbeaud.com/jardin/fiches/gingembre-planter-cultiver.php>. [Consulté le 09/05/2018].
- 33- Gigon F. (2012). Le gingembre, une épice contre la nausée. DOI 10.1007/s10298-012-0695-4. *Phytothérapie – Phytothérapie clinique.* 87-88.
- 34- Graser Y., Volovsek M., Arrington J., Schonian G., Presber W., Mitchell T.G and Vilgalys R. (1996). Molecular markers reveal that population structure of the human pathogen *Candida albicans* exhibits both clonality and recombination. *Proc. Natl. Acad.Sci. U S A.* 93. 1247-12477.
- 35- Grillot R. (1995). *Les mycoses humaines : démarche diagnostique.* Paris. Edition Elsevier Science. Page 15.
- 36- Hanif M. A., Al-Maskari M.Y., Al-Maskari A., Al-Shukaili A., Al-Maskari A.Y. and Al-Sabahi J. N. (2011). Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of unexplored Omani basil. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5 (5). 751–757.
- 37- INPN : Inventaire National du Patrimoine Naturel. [En ligne]. https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/447936/tab/taxo. [Consulté le 07/06/2018].

38- ISO Online Browsing Platform (OBP). ISO 4720 :2009. [En ligne]. <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:4720:ed-3:v1:fr> [consulté le 08/03/2018].

39-ITIS Taxonomic Workbench. [En ligne].

https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=42652#null. [Consulté le 23/03/2018].

40- Jung S. (2005). Apport des drogues végétales dans la prévention des maladies cardiovasculaires liées à l'hypocholestérolémie. Thèse pour l'obtention de Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie, de l'université Henri Poincaré-Nancy. Faculté de pharmacie. 15- 16.

41- Khadri S (2009). Evaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de l'ail cultivé (*Allium sativum*) de l'est algérien vis-à-vis de différentes souches de *Pseudomonas aeruginosa*. Mémoire Présenté en vue de l'obtention du diplôme de magister en biochimie. Université Badji Mokhtar Annaba. Page 54.

42- Lagane C. (2007). Rôle de l'IL-13 et des ligands de ppar- γ dans la réponse anti-infectieuse des macrophages murins et des monocytes humains vis-à-vis de *Candida albicans*. Thèse de doctorat, de l'université Toulouse III, discipline : immunopathologie, oncogénèse et signalisation cellulaire, France. 13-14.

43- Lebeau J. (2004). Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie. Edition Masson, Paris. Page 157.

44- Makhloufi A. (2010). Etude des activités antimicrobienne et antioxydante de deux plantes médicinales poussant à l'état spontané dans la région de Bechar (*Matricaria pubescens* (Desf.) et *Rosmarinus officinalis* L) et leur impact sur la conservation des dattes et du beurre cru. Thèse de doctorat en Biologie, spécialité Microbiologie et sécurité sanitaire des aliments, de l'université Aboubaker Belkaid, Faculté des sciences. Laboratoire Produits Naturels. Page 5.

- 45- Mayer F. (2012). Utilisations thérapeutiques des huiles essentielles : étude de cas en maison de retraite. Thèse pour l'obtention de Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie, de l'université de Lorraine, Faculté de pharmacie. 25-26.
- 46- Mazouzi S. (2011). Contribution à l'étude phytochimique et biologique des deux extraits d'ail (*Allium sativum*) chez le lapin hyperthyroïdien. Mémoire de Master en Biochimie appliquée. Laboratoire de biochimie et microbiologie appliquées, Université Badji Mokhtar de Annaba. [Mémoire en ligne] https://www.memoireonline.com/02/12/5370/m_Contribution--l-etude-phytochimique-et-biologique-des-deux-extraits-dail-allium-sativum-chez7.html. [Consulté le 11/03/2018].
- 47- Michael A., Pfaller *et al.* (2002). National committee for clinical laboratory standards I : M27-A2. Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard—Second Edition. Volume 22 Number 15. ISBN 1-56238-469-4. 6-18.
- 48- Mister Ginseng. [En ligne]. <https://mr-ginseng.com/gingembre/> [consulté le 09/05/2018].
- 49- Mnayer D. (2014). Eco-Extraction des huiles essentielles et des arômes alimentaires en vue d'une application comme agents antioxydants et antimicrobiens. Thèse de doctorat en sciences de l'université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, spécialité en Chimie. 10, 13, 14, 26.
- 50- Morgan J. (2005). Global trends in candidemia: review of reports from 1995-2005. *Curr .Infect. Dis. Rep.* 7, 39, 429.
- 51- Morin O. (1994), *Aspergillus* et aspergilloses: biologie, Ed. Techniques Encyl. Med. Chir. (Elsevier, Paris), Maladies infectieuses 8-600-A-10. Page 95.
- 52- Moro Buronzo A. (2008). Grand guide des huiles essentielles. Edition Hachette pratique. 14-21, 22, 23-26.
- 53- Moving tahiti. . [En ligne]. <https://movingtahiti.com/decoration/decoration-jardin/faire-pousser-gingembre-chez-soi/> [Consulté le 09/05/2018].

- 54- Normes Française EN 12353. (2013). 6,16, 18.
- 55- Paris M., Hurabielle M. (1981). Abrégé de matière médicale (Pharmacognosie). Tome 1 : Généralités – Monographies (1^{ère} partie). 8-14.
- 56- Patterson T.F. (2005). Advances and challenges in management of invasive mycoses. Lancet 366:1013. Page 25.
- 57- Penntybio. [En ligne]. <http://www.penntybio.com/content/40-les-huiles-essentielles-contre-les-virus> [consulté le 23/03/2018].
- 58- Pielquin P. Secrets des huiles essentielles. (2015). Edition Action web. 10, 13.
- 59- Piochon M. (2008). Étude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore Laurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques et hémi-synthèse. Mémoire pour l'obtention d'une maîtrise en ressources renouvelables, de l'université du Québec à Chicoutimi. Page 18.
- 60- Poirot T. (2016). Bon usage des huiles essentielles, effets indésirables et toxicologie. Thèse pour l'obtention de Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie, de l'université de Lorraine, Faculté de pharmacie. 19-20, 25,27.
- 61- Randrianarivelo R. (2010). Étude de l'activité antimicrobienne d'une plante endémique de Madagascar « *Cinnamosma fragrans* », alternative aux antibiotiques en crevetticulture. Thèse pour l'obtention de grade de Docteur en science de la vie, de l'université d'Antananarivo, option Biochimie (Biotechnologie – Microbiologie). Page 37.
- 62- Reyhan I and Mihriban K (2007). Control of *Aspergillus niger* with garlic, onion and leek extracts. Uludag University, Agricultural Faculty, Food Engineering Department, Görükle, Bursa, Turkey. African Journal of Biotechnology Vol. 6 (4). 384-387.
- 63- Rex J-H *et al.* (2009). National committee for clinical laboratory standards : M44-A2. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline, Second Edition. Volume 29 Number 17. ISBN 1-56238-703-0. Page 7.

- 64- Roguet I. *et al.*, (2014). Dictionnaire médical Vidal 90^{ème} édition.. Issy-Les-Moulineaux Cedex 9, France. 123, 285.
- 65- Rossi PG, Berti L, Panighi J, et al (2007). Antibacterial action of essential oils from Corsica. *J Essent Oil Res* 19. 82, 176.
- 66- Saffidine K. (2015). Etude analytique et biologique des flavonoïdes extraits de *Carthamus caeruleus* L. et *Plantago major* L. Thèse de Doctorat en Microbiologie. Université Farhat Abbas. Page 5.
- 67- Samaranayake L.P., Fidel P.L., Naglik J.R., Sweet S.P., Teanpaisan R., Coogan M.M., Blignaut E and Wanzala P. (2002). Fungal infections associated with HIV infection. *Oral Dis.* 2. 151-160.
- 68- Selvakumar P., Edhaya-Naveena B. et Prakash D.S. (2012) .Studies on the antidandruff activity of the essential oil of *Coleus amboinicus* and *Eucalyptus globules*, Asian pacific journal of tropical biomedicine. 715 - 719.
- 69- Sheehan, D.J., Hitchcock, C.A. and Sibley C.M. (1999). Current and emerging azole antifungal agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12(1). 40, 79.
- 70- Sheehan D-J *et al.* (2004). National committee for clinical laboratory standards: M44-A. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts. Page 5.
- 71- Sudbery P., Gow N. and Berman J. (2004). The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends. Microbiol.* 12. 317-324.
- 72- Sudbery P. E. (2001). The germ tubes of *Candida albicans* hyphae and pseudohyphae show different patterns of septin ring localization. *Mol. Microbiol.* 41. 19-31.
- 73- Tabuc C. (2007). Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Thèse de doctorat, Institut national polytechnique de Toulouse et de l'université de Bucarest, France et Roumanie. 30- 31.

- 74- Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A. and Cliver, D. O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21 (9). 1199, 1218.
- 75- Thangara J.H.S., Adjei O., Allen B.W. and Portaels F. (2000). Invitro activity of ciprofloxacin, sparfloxacin, ofloxacin, amikacin and rifampicin against Ghanaian isolates of *Mycobacterium ulcerans*. *Journal Antimicrobial Agents Chemoter*, 45 (2). 231-233.
- 76- Trében M. (1985). La santé à la pharmacie du bon Dieu. Conseils et pratique des Simples (des plantes médicinales). 4^{ème} édition. Edition WILHEM ENNSTHALER, STEYR. Page 6.
- 77- Tortorano A.M., Kibbler C., Peman J., Bernhardt H., Klingspor L. and Grillot R. (2006). Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents*.27: 359. Page 66.
- 78- Varga, Frisvad & Samson, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57(8): 57 (2007). [En ligne] <https://mycomap.com/taxonomy/199935-aspergillus-niger> . [consulté le 05/03/2018].
- 79- Wagner. (1993). *Pharmazeutische Biologie. Drogen und irhe inhaltsstaffe*, Gustav Fisher Verlag. Sturtgart-New-York. Page 50.
- 80- Wan J., Wilcock, A. and Oventry M. J. (1998). The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Applied Microbiology*, 84 (2). 152–158.
- 81- WHO. (1999). Genève, Suisse. Monographs on selected medicinal plants. Volume 1. 16, 17, 20-23, 277, 281.
- 82- Young L.Y., Hull C.M. and Heitman J. (2003). Distribution of ergosterol biosynthesis confers resistance to amphotericin B in *Candida lusitaniae* *Antimicrob. Agents Chemother*, Page 47.
- 83- Zouari Chekki R., Snoussi A., Hamrouni I. and Bouzouita N. (2014). Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of Tunisian garlic (*Allium sativum*) essential oil and ethanol extract. *Mediterranean Journal of Chemistry* Page 949.

84- Zrira S. and Benjlali B. (1991). Effect of drying on leaf oil production of Moroccan *Eucalyptus camaldulensis*. j .ess.oil res. 3. 117-119.

85- Zrira S. and Benjlali B. (1991). Essential oils of twenty seven eucalyptus species grown in morocco. j.ess. oil res. 4. 259-264.

ANNEXES

Annexe 1

COMPOSITION DE LA SOLUTION CRYOPROTECTRICE

(pour bactéries sporulées, champignons)

(NF EN 12353, 2013).

Extrait de bœuf.....	3,0 g
Tryptone, digestion pancréatique de caséine	5,0 g
Glycérol (C ₃ H ₈ O ₃)	150,0 g
Eau distillée.....qsp	1000 ml

Dissoudre les composants dans de l'eau bouillante. Stériliser dans l'autoclave.

Après stérilisation, le pH de la solution doit – être équivalent à 6,9 ±0,2.

Annexe 2

COMPOSITION ET PREPARATION DE L'EAU PHYSIOLOGIQUE A 8,5‰

NaCl	8,5 g
Eau distillée.....qsp	1000 ml

Dissoudre complètement le NaCl de l'eau distillée. Stériliser dans l'autoclave

KHEBBEB Leïla

BOUANAKA Hamza

Date de soutenance : 05/ 06 /2018

Intitulé:

Étude comparative, *in vitro*, entre l'effet des antifongiques de synthèse et les huiles essentielles d'*Allium sativum* et *Zingiberis rhizoma* sur deux espèces d'intérêt médical : *C. albicans* et *A. niger*.

Master en Biotechnologie

Spécialité : Mycologie et Biotechnologie Fongique

Les infections fongiques représentent actuellement un véritable problème de santé publique. Bien que les traitements soient disponibles, ils n'en demeurent pas moins qu'ils restent coûteux et souvent liés à l'émergence de souches résistantes à certains antimycosiques. La recherche de nouvelles molécules actives est donc une nécessité. Pour contribuer à l'effort de recherche d'alternative thérapeutiques, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'activité antifongique, *in vitro*, de deux huiles essentielles provenant d'une plante liliacée qui est l'ail et d'une autre tropicale, le gingembre, considérées comme étant des condiments à large consommation en Algérie. Les huiles essentielles d'*Allium sativum* et *Zingiberis rhizoma*, obtenues par hydrodistillation et par technique Solvent Free Microwave Extraction (SFME), ont été testées sur de deux espèces fongiques responsables des mycoses humaines : *Candida albicans* et *Aspergillus niger*. Les résultats obtenus montrent une activité antifongique significative des extraits utilisés avec un effet plus marqué sur *Aspergillus niger*. En effet, cette activité s'est révélée meilleure que celle du fluconazole et de l'amphotéricine B.

Mots clés : Activité antifongique, Huile essentielle, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*,
Allium sativum, *Zingiberis rhizoma*