

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement et de la Recherche Scientifique



ECOLE NATIONALE SUPERIEURE POLYTECHNIQUE
Département du Génie de l'Environnement
Laboratoire des Sciences et Techniques Environnementales

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

Présenté par :

IGUER Amira

pour l'obtention du diplôme
d'ingénieur d'état en Génie de l'Environnement

Thème

Etude comparative des activités antimicrobiennes
de quelques extraits végétaux

Soutenu le 30 juin 2009 devant le jury composé de

| | | | |
|------------------------|----------------------------|-----------------------|------------|
| Président : | Mr A. NAMANE | Maître de conférences | E.N.S.P. |
| Directrice: | Mme A. HELLAL | Professeur | E.N.S.P. |
| Examinatrices : | Mme K. M. MOUSSAOUI | Professeur | E.N.S.P. |
| | Mme N. SAHRAOUI | Chargée de cours | U.S.T.H.B. |

Promotion Juin 2009

E.N.S.P, 10 Avenue Hassen Badi – El Harrach - Alger

Remerciements

Ce travail a été réalisé au Laboratoire des Sciences et Techniques de l'Environnement du département du Génie de l'Environnement de l'Ecole Nationale Supérieure Polytechnique d'Alger.

Je tiens à témoigner ma profonde reconnaissance à Madame A. HELLAL, Professeur à l'E.N.S.P. , pour m'avoir confiée ce sujet ; mais aussi pour sa générosité, sa disponibilité, ses conseils et orientations sans lesquels ce travail n'aurait pas pu aboutir.

Je tiens à remercier Monsieur A.NAMANE, Maître de conférences à l'E.N.S.P. , pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider ce jury.

J'adresse également mes remerciements aux membres du jury :

Madame K. M. MOUSSAOUI, Professeur à l'E.N.S.P.

Madame N. SAHRAOUI, Chargée de cours à l'U.S.T.H.B.

qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger mon travail.

Je remercie tous ceux qui ont contribué de prêt ou de loin à ce travail ainsi que tous les membres de mon Département pour leurs conseils, leur soutien, leur convivialité et pour les bons moments partagés ces trois dernières années.

Je remercie mes amis et toute ma famille qui tout au long de ma vie ont été présents et tout particulièrement mon adorable petit frère.

Enfin , j'adresse mon immense gratitude à mes très chers parents qui m'ont toujours soutenue, encouragée, guidée et aimée, et sans qui je ne serais pas où j'en suis aujourd'hui.

Merci.

Liste des figures

| Figure | page |
|--|------|
| Figure I-1: Orange (<i>Citrus sinensis</i>) | 5 |
| Figure I-2 : lavande (<i>Lavandula angustifolia</i>) | 6 |
| Figure I-3 : Thym (<i>Thymus vulgaris</i>) | 6 |
| Figure I-4 : Romarin (<i>Rosmarinus officinalis</i>) | 8 |
| Figure I-5 : <i>Escherichia coli</i> | 9 |
| Figure I-6 : <i>Staphylococcus aureus</i> | 11 |
| Figure I-7 : <i>Micrococcus luteus</i> | 12 |
| Figure I-8 : <i>Listeria monocytogene</i> | 13 |
| Figure I-9 : <i>Enterococcus faecalis</i> | 14 |
| Figure I-10 : <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 15 |
| Figure I-11: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 16 |
| Figure I-12 : <i>Candida albicans</i> | 17 |
| Figure I-13: <i>Salmonella typhimurium</i> | 18 |
| Figure I-14 : <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 19 |
| Figure I-15 : <i>Aspergillus niger</i> | 20 |
| Figure I-16 : <i>Rhizopus arrhizus</i> | 20 |
| Figure I-17 : Diffusion de l'huile essentielle dans la gélose à partir du disque imbibé | 22 |
| Figure I-18 : Profile de diffusion de l'huile essentielle dans la gélose | 23 |
| Figure I-19 : Diffusion de l'huile essentielle dans la gélose à partir du puits | 23 |
| Figure I-20 : Exemple de lecture de CMI | 24 |
| Figure III-15 : Histogramme des diamètres des zones d'inhibition des souches bactériennes en fonction des huiles essentielles étudiées | 54 |
| Figure III-16 : Histogramme des diamètres des zones d'inhibition des souches fongiques en fonction des huiles essentielles étudiées | 55 |

Liste des tableaux

| Tableau | Page |
|---|------|
| Tableau III-1 : Résultats du test de sensibilité à l'H.E d'orange et catégorie d'inhibition (Méthode des puits) | 35 |
| Tableau III-2 : Résultats du test de sensibilité à l'H.E de lavande et catégorie d'inhibition (Méthode des disques) | 36 |
| Tableau III-3 : Résultats du test de sensibilité à l'H.E de lavande et catégorie d'inhibition (Méthode des puits) | 37 |
| Tableau III-4 : Résultats de la détermination de la CMI et de la CMB pour l'H.E de lavande. | 39 |
| Tableau III-5 : Résultats du test de sensibilité à l'H.E de romarin par la méthode des disques et catégorie d'inhibition. | 41 |
| Tableau III-6 : Résultats du test de sensibilité à l'H.E de romarin par la méthode des puits et catégorie d'inhibition. | 42 |
| Tableau III-7 : Résultats du test de sensibilité à l'H.E de thym par la méthode des disques et catégorie d'inhibition. | 44 |
| Tableau III-8 : Résultats du test de sensibilité à l'H.E de thym par la méthode des puits et catégorie d'inhibition | 45 |
| Tableau III-9 : Résultats de la détermination de la CMI et de la CMB pour l'H.E de thym | 47 |
| Tableau III-10 : Résultats du test de sensibilité à l'H.E d'orange sur les souches fongiques | 50 |
| Tableau III-11 : Résultats du test de sensibilité à l'H.E de lavande sur les souches fongiques | 51 |
| Tableau III-12 : Résultats du test de sensibilité à l'H.E de romarin sur les souches fongiques | 51 |
| Tableau III-13 : Résultats du test de sensibilité à l'H.E de thym sur les souches fongiques | 52 |
| Tableau III-14 : Résultats du test de sensibilité sur les souches fongiques « orange+romarin » | 53 |

Liste des abréviations

H.E. : Huile Essentielle.

CMI : concentration minimale inhibitrice.

CMB : concentration minimale bactéricide.

UFC : unité formant colonie.

IPA : institut Pasteur d'Alger.

LSTE : Laboratoire des Sciences et Techniques Environnementales de l'Ecole Nationale Supérieure Polytechnique.

ATCC: American Type Culture Collection.

PCA: Plat Count Agar

YMA: Yeast Malt Ager

OGA : Gélose glucosée à l'Oxytétracycline.

| | |
|-----------------------------|-----|
| Remerciements | I |
| Liste des figures | II |
| Liste des tableaux..... | III |
| Liste des abréviations..... | IV |

Sommaire

| | |
|--|----|
| Introduction générale | 1 |
| Partie I : Etude bibliographique..... | 3 |
| Chapitre I-I : Généralités sur les extraits végétaux..... | 3 |
| I-I-1- Définition générale | 3 |
| I-I-2- Origine..... | 3 |
| I-I-3- Production et procédés d'extraction | 3 |
| I-I-4- Propriétés antimicrobiennes et utilisations | 4 |
| Chapitre I-II : Extraits végétaux étudiés | 5 |
| I-II-1- Huile essentielle d'orange..... | 5 |
| I-II-2- Huile essentielle de lavande..... | 5 |
| I-II-3- Huile essentielle de thym | 6 |
| I-II-4- Huile essentielle de romarin..... | 7 |
| Chapitre I-III : Généralités sur les microorganismes pathogènes..... | 9 |
| I-III-1- Définition générale | 9 |
| I-III-2- Généralités sur les bactéries pathogènes étudiées..... | 9 |
| I-III-2-1- Escherichia coli | 9 |
| I-III-2-2- Staphylococcus aureus | 11 |
| I-III-2-3- Micrococcus luteus | 12 |
| I-III-2-4- Listeria monocytogenes | 13 |
| I-III-2-5- Enterococcus faecalis..... | 14 |
| I-III-2-6- Klebsiella pneumoniae | 15 |

| | |
|---|----|
| I-III-2-7- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 16 |
| I-III-2-8- Généralité sur le genre <i>Salmonella</i> | 17 |
| I-III-3- Levures étudiées..... | 18 |
| I-III-3-1- <i>Candida albicans</i> | 18 |
| I-III-3-2- <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 19 |
| I-III-4- Moisissures étudiées..... | 19 |
| I-III-4-1- <i>Aspergillus niger</i> | 19 |
| I-III-4-2- <i>Rhizopus stolonifer</i> | 20 |
| Chapitre I-IV : Activité antimicrobienne | 21 |
| I-IV-1- Activité antibactérienne..... | 21 |
| I-IV-1-1- Sensibilité et résistance..... | 21 |
| I-IV-1-2- Aromatogramme | 21 |
| I-IV-1-3- Bactéricidie..... | 24 |
| I-IV-1-4- Bactériostase | 24 |
| I-IV-1-5- Paramètres de l'activité in vitro des huiles essentielles :..... | 24 |
| I-IV-1-6- Cinétique de bactéricidie | 25 |
| I-IV-2- Activité antifongique | 25 |
| I-IV-3- Association d'huiles essentielles | 25 |
| Partie II : Matériel et méthodes | 27 |
| Chapitre II-I : Huiles essentielles | 27 |
| Chapitre II-II : Etude de l'activité antimicrobienne | 28 |
| II-II-1- Souches microbiennes | 28 |
| II-II-2- Détermination de la sensibilité des bactéries aux extraits végétaux « aromatogramme »..... | 28 |
| II-II-3- Détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI et de la concentration minimale bactéricide CBM..... | 30 |
| II-II-4- Cinétique de l'activité antibactérienne..... | 31 |

| | |
|--|----|
| II-II-5- Détermination de la sensibilité des souches fongiques aux extraits végétaux..... | 32 |
| Partie III : Résultats et discussions..... | 34 |
| Chapitre III-I - Etude de l'activité antibactérienne | 34 |
| III-I-1 – Huile essentielle d'orange : | 35 |
| III-I-2 – Huile essentielle de lavande : | 36 |
| III-I-3 – Huile essentielle de romarin | 41 |
| III-I-4 – Huile essentielle de thym..... | 44 |
| III-I-5- Détermination de la cinétique de bactéricidie de <i>Listeria monocytogenes</i> en présence de l'huile essentielle de thym | 48 |
| Chapitre III-II - Etude de l'activité antifongique | 50 |
| III-II-1- Huile essentielle d'orange | 50 |
| III-II-2- Huile essentielle de lavande | 50 |
| III-II-3- Huile essentielle de romarin | 51 |
| III-II-4- Huile essentielle de thym : | 52 |
| III-II-5- Association d'huiles essentielles | 52 |
| Discussion générale | 53 |
| Conclusion générale..... | 57 |

Références bibliographiques

Annexes

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

La présence de résidus de substances médicamenteuses dans l'environnement est liée à des rejets émis tout au long de leur cycle de vie depuis la fabrication des principes actifs, leurs utilisations en milieu hospitalier, vétérinaire ou à usage personnelle, jusqu'à la gestion des médicaments non utilisés.

Cette présence dans les différents compartiments de l'environnement résulte d'un ensemble de caractéristiques propres à chaque substance : quantité fabriquée, métabolisation chez l'homme et l'animal, propriétés physico-chimiques et biodégradabilité de la substance et de ses métabolites dans l'eau, les sols et les chaînes alimentaires (1).

Les antibiotiques peuvent induire des effets liés à leurs cibles spécifiques, c'est-à-dire influencer les biomasses bactériennes de l'environnement que ce soit dans les sols, les eaux, les stations d'assainissement ou les réseaux de distribution d'eau potable. Dans ce cas, des perturbations peuvent se produire au sein des cycles biologiques épurateurs naturels et donc des dysfonctionnements peuvent apparaître au sein des systèmes d'assainissement (2).

De plus, l'usage extensif des agents antimicrobiens chimiques conduit à la sélection de souches bactériennes et fongiques plus résistantes (3).

Face aux limites thérapeutiques des médicaments chimiques et au problème émergent des émissions de substances médicamenteuses dans l'environnement, le développement de la recherche sur les plantes médicinales a été orienté vers l'obtention de phytomédicaments.

La nature constitue un immense gisement de molécules actives d'origine végétale, et les ressources de la flore sont loin d'être totalement inventoriées.

Dans le monde entier, on continue aujourd'hui à rechercher des plantes susceptibles d'être utilisées comme base de nouveaux traitements. Relativement récente, cette recherche systématique des ressources thérapeutiques végétales ouvre des perspectives extrêmement prometteuses pour l'industrie du médicament (4).

Dans le présent travail, nous nous intéresserons à l'évaluation et à l'étude de l'activité antimicrobienne de certains extraits végétaux. Notre choix s'est porté sur l'huile essentielle de lavande, d'orange, de thym et de romarin dont nous avons déterminé les différents paramètres de leur activité sur des micro-organismes pathogènes.

Partie I :
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Partie I : Etude bibliographique

Chapitre I-I : Généralités sur les extraits végétaux

I-I-1- Définition générale

Les essences ou huiles essentielles sont des substances odorantes, peu solubles dans l'eau mais plus ou moins solubles dans les alcools et éthers. Elles n'ont pas le toucher gras et onctueux des huiles fixes dont elles se distinguent par leur volatilité et leur odeur. Ces huiles sont obtenues soit à partir de matières premières naturelles par distillation à l'eau ou à la vapeur d'eau, soit à partir des fruits par des procédés mécaniques, et sont séparées de la phase aqueuse par des procédés physiques (5,6).

I-I-2- Origine

En principe, toutes les parties d'une plante contiennent des huiles essentielles, mais elles sont souvent plus concentrées dans les brindilles, les fleurs et les graines. Ses huiles sont sécrétées au sein du cytoplasme de certaines cellules où se rassemblent de petites gouttelettes comme la plupart des substances lipophiles. Ensuite elles sont stockées dans des cavités résultant de la fusion de plusieurs cellules (7).

I-I-3- Production et procédés d'extraction

Le procédé d'obtention des HE intervient d'une façon déterminante sur sa composition chimique. Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales, cette diversité est due à la variété des matières premières et à la sensibilité considérable de certains de leurs constituants (8).

Parmi les procédés utilisés on peut citer :

- Extraction par distillation
- Entraînement à la vapeur d'eau
- Hydrodiffusion

- Hydrodistillation
- Extraction aux solvants volatils
- Extraction par expression à froid
- Extraction au CO₂ supercritique

I-I-4- Propriétés antimicrobiennes et utilisations

Empiriquement reconnues depuis des siècles, la confirmation scientifique de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles est récente. Elle ne date que du début du siècle dernier avec les travaux du Dr Gattefossé, le père de l'aromathérapie en France. Depuis ce temps, l'utilisation des huiles essentielles s'est développée jusqu'à devenir depuis plus d'une vingtaine d'années, une sérieuse alternative à la médecine des antibiotiques dans les pathologies infectieuses.

De nombreuses études traitent de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles, qu'elles soient citées dans des ouvrages, dans des journaux spécialisés de microbiologie ou présentées lors de congrès d'aromathérapie scientifique.

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles se trouve à la base des médecines dites alternatives, de nombreux procédés utilisés dans la conservation des produits alimentaires crus ou cuits, de substances actives exploitées dans les produits pharmaceutiques. Cette activité a été utilisée dernièrement pour la conservation du patrimoine bibliographique des musées (9) et elle est naissante pour traiter la qualité de l'air dans les bâtiments (10).

Chapitre I-II : Extraits végétaux étudiés

I-II-1- Huile essentielle d'orange

L'oranger, *Citrus sinensis*, est un arbre de la famille des rutacées, qui produit les oranges. Les orangers dépassent rarement 9 m de haut. Les feuilles sont persistantes, ovales et luisantes et les fleurs blanches et parfumées.



Figure I-1: Orange (*Citrus sinensis*) (11, 12).

L'orange renferme une huile essentielle riche en monoterpènes (limonènes, mycènes, alpha-pinène) et en alcool monoterpénique (linalol) (12,13). L'huile essentielle d'orange possède des propriétés antiseptiques aériennes, des effets sédatifs et calmants. Elle tonifie également la digestion (14).

I-II-2- Huile essentielle de lavande

La lavande, *Lavandula angustifolia*, est un sous-arbrisseau en forme de buisson originaire du pourtour méditerranéen atteignant 30 à 60 cm de haut. Les rameaux sont dressés, très ramifiés et touffus. Les feuilles, étroites, sont de couleur vert cendrée. Les petites fleurs sont groupées en épi terminal. Le fruit, un akène, renferme une graine noirâtre (4).

Les fleurs sont les parties utilisées dans la lavande. Récoltées juste avant la fin de la floraison (en juillet-août), elles sont mises à sécher ou distillées afin que l'on puisse en extraire l'huile essentielle (l'essence de lavande). Elles contiennent au minimum 13 ml/kg d'huile essentielle.

La lavande renferme une huile essentielle riche en monoterpènes. Les constituants actifs sont l'acétate de linalyle, le linalol et le terpinène-4-ol (15).



Figure I-2: Lavande (*lavandula angustifolia*) (16, 17)

L'huile essentielle de lavande possède outre de puissantes propriétés antimicrobiennes et antiseptiques, une action hypotensive reconnue et des effets sédatifs agissant sur le système nerveux central. A hautes doses, c'est un neurotoxique. Comme toutes les huiles essentielles, elle doit être utilisée avec prudence, en particulier en usage interne (4).

I-II-3- Huile essentielle de thym

Le thym commun, *Thymus vulgaris*, est un sous-arbrisseau vivace, originaire des régions méditerranéennes, aux tiges dressées et ramifiées. Il porte de petites feuilles roses ou blanches, enroulées sur les bords et regroupées en épis.

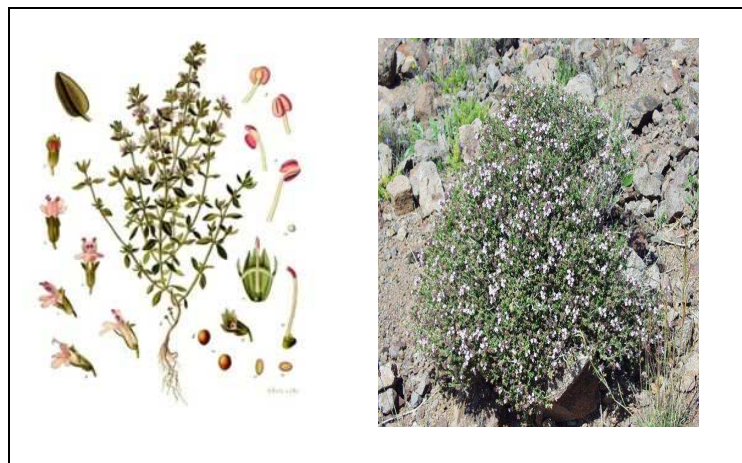


Figure I-3: Thym (*Thymus vulgaris*) (16, 18)

Les feuilles et les tiges fleuries sont récoltées en début de floraison puis séchées avec précaution à l'abri du soleil. Elles contiennent des flavonoïdes et 0,5 à 2 % d'huile essentielle. L'huile essentielle des thyms à phénols (les thyms pharmaceutiques) contient 50 à 60 % de thymol et de carvacrol (4).

Le thym agit comme un décontractant musculaire ; cette action serait due aux flavonoïdes.

L'activité antispasmodique du thym est utilisée pour traiter les désordres de la digestion : digestion lente, ballonnements, éructations, flatulences, vésicule paresseuse. On le prescrit aussi souvent pour apaiser la toux et les enrouements passagers.

En usage local, il est employé en cas de rhume pour dégager le nez. Il est également conseillé pour soigner les petites plaies.

Des extraits de thym ainsi que son huile essentielle sont fortement antimicrobiens : cette propriété a été démontrée in vitro sur divers champignons, levures et bactéries. Elle est également antispasmodique. Tous les Chimio types sont actifs, mais l'activité bactéricide est plus marquée pour les types à thymol. La croissance d'*Helicobacter pylori* est également inhibée, de même qu'un certain nombre de souches bactériennes et fongiques. Les propriétés antivirales in vitro d'un extrait de thym sont liées à sa teneur en acide rosmarinique et ne peuvent être mises à profit que par voie topique (15).

I-II-4- Huile essentielle de romarin

Le romarin, *Rosmarinus officinalis*, est un arbrisseau aromatique touffu et rameux d'environ 1 m de haut, commun dans tout le bassin méditerranéen, il possède des feuilles persistantes opposées, étroites, presque en forme d'aiguille, blanches et duveteuses sur la face inférieure. Les fleurs, qui apparaissent en mai - juin, sont disposées en épis vers le sommet des rameaux.

Les parties utilisées dans le romarin sont les sommités fleuries et les feuilles. Les premières sont récoltées à la floraison, puis séchées. Les feuilles, persistantes, peuvent se récolter en toute saison ; une fois mondées, elles sont simplement mises à sécher, elles contiennent au minimum 12 ml/kg d'huile essentielle (4).

Le romarin est riche en principes actifs. Son huile essentielle (1 à 2.5%) renferme du cinéole, du camphre, du camphène, de la verbénone et de l'alphapinène.



Figure I-4 : Romarin (*Rosmarinus officinalis*) (16, 19)

Les propriétés immunostimulantes de la plante tout comme son action sur la fonction hépato-biliaire et sur le système nerveux central lui valent le statut de plante adaptogène, c'est-à-dire qui aide le corps à résister et les organes à mieux fonctionner. Elle est aussi très utilisée en agroalimentaire comme conservateur et antioxydant pour la conservation des viandes et graisses (13).

Chapitre I-III : Généralités sur les microorganismes pathogènes

I-III-1- Définition générale

Les bactéries ayant colonisé la plupart des biotopes, certaines vivant au contact de l'homme tendent à coloniser également l'intérieur de l'organisme. Le conflit entre cette agression et les défenses naturelles aboutit alors à la maladie bactérienne et ces bactéries sont appelées bactéries pathogènes (20).

Le pouvoir pathogène ou pathogénicité d'une bactérie est donc sa capacité à provoquer des troubles chez un hôte. Il dépend de son pouvoir invasif (capacité à se répandre dans les tissus et à y établir un/des foyers infectieux), et de son pouvoir toxigène (capacité à produire des toxines).

On distingue deux catégories de bactéries pathogènes :

Strictes ou spécifiques : provoquant des troubles quel que soit le patient.

Opportunistes : provoquant des troubles lorsque les défenses immunitaires de l'hôte sont affaiblies (21).

I-III-2- Généralités sur les bactéries pathogènes étudiées

I-III-2-1- Escherichia coli

I-III-2-1-1- Caractère bactériologique

Escherichia coli, également appelé **colibacille** (bacille du colon) ou **E. coli**, est une espèce type de la tribu Escherichieae, qui possède les caractères bactériologiques classiques de la famille des Entérobactériacées.

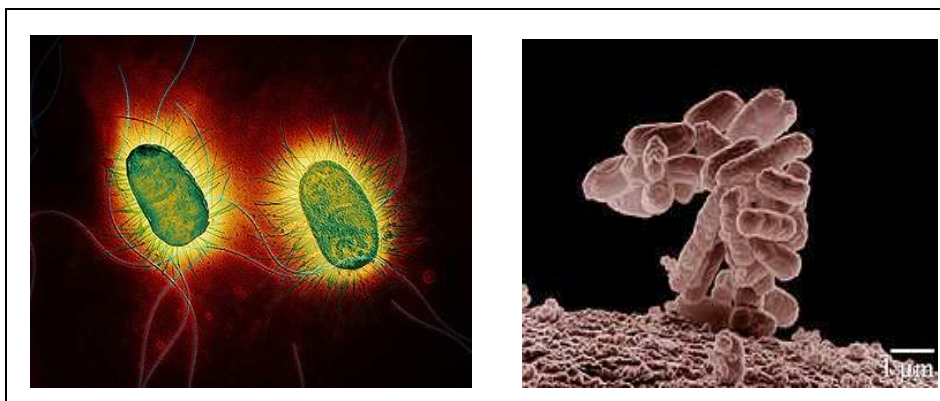


Figure I-5 : *Escherichia coli* (22, 23)

En forme de bâtonnet à extrémités arrondies ; elle mesure au plus 2 à 3 µm de long pour 0,5 µm de large. Elle est entourée de nombreux et longs cils péritriches, d'où une relative mobilité cohérente (16 µm/seconde).

Le germe est à **Gram négatif** et on ne décèle pas de spores même si parfois on croit observer une forme de pseudo-résistance apparentée à une pseudo-capsule (24).

I-III-2-1-2- Habitat

Hôte normal de l'intestin de l'homme et de nombreux animaux ; elle est un indicateur de contamination fécale dans le milieu naturel.

E. Coli est une bactérie commensale et saprophyte ou mutualiste, parfois pathogène opportuniste (20,24).

I-III-2-1-3- Pouvoir pathogène

Infections extra-intestinales

Infections urinaires : la majorité des infections urinaires est due à E. coli.

Infections abdominales : ce sont des cholécystites, péritonites ou salpingites.

Infections méningées : les méningites néonatales sont souvent graves.

Les bactériémies consécutives à une infection localisée peuvent évoluer vers un choc septique gravissime dû à l'action du lipopolysaccharide (LPS) ou endotoxine.

Infections intestinales

Souches de E. coli entéropathogènes : aujourd'hui rarement rencontrées dans les pays développés, mais elles sont une cause majeure de diarrhées sévères chez les jeunes enfants des pays en voie de développement.

Souches de E. coli entéro-invasives : responsables de syndromes dysentériques.

Souches de E. coli productrices d'entérotoxines : cause principale de diarrhées chez les enfants, dans les pays en développement. Elles sont aussi la cause la plus fréquente de la diarrhée des voyageurs, atteignant les sujets étrangers voyageant dans ces pays.

Souches de E. coli entérohémorragiques productrices de vérotoxines : responsables de cas épidémiques ou sporadiques de colites hémorragiques.

Souches de E. coli entéroaggrégatif : responsables de diarrhées persistantes (> 14 jours) chez des enfants dans les pays sous-développés (24).

I-III-2-2- Staphylococcus aureus

I-III-2-2-1- Caractères bactériologiques

Le staphylocoque doré « *Staphylococcus aureus* » est l'espèce la plus pathogène du genre *Staphylococcus*.

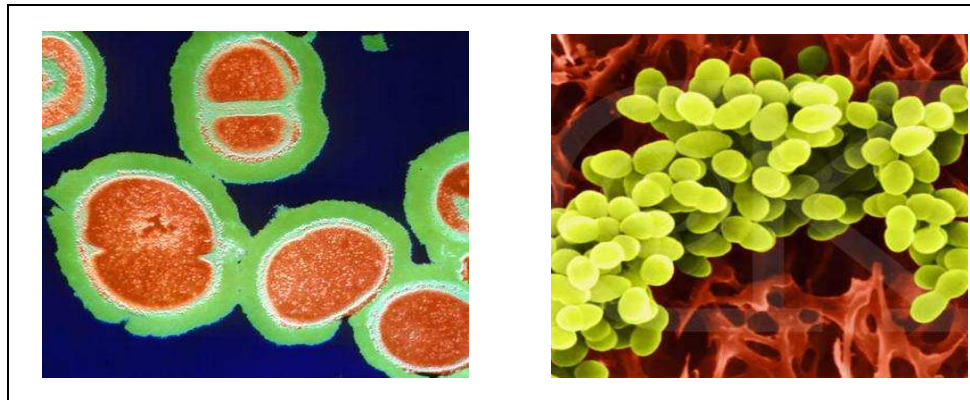


Figure I-6 : *Staphylococcus aureus* (25)

C'est un germe cocciforme, cocci arrondis de 0,8 à 1 μm de diamètre donnant des diplocoques à la division diamétrale. A Gram positif, il présente au frottis sur lame des amas caractéristiques en forme de grappe (grappe de raisin, parfois des chainettes courtes de 4 à 8 éléments), immobile, dépourvu de capsule et de spore et à caractère aérobie-anaérobie facultatif (24).

I-III-2-2-2- Habitat et mode de transmission

S. aureus est un germe ubiquitaire, retrouvé dans le sol, l'air et l'eau. C'est un commensal de la peau et des muqueuses de l'homme. On le trouve à l'état normal dans l'oropharynx, les fosses nasales, dans les selles, au niveau du périnée ou des aisselles. Un tiers des individus sains est porteur de *S. aureus* au niveau des fosses nasales (20).

I-III-2-2-3- Pouvoir pathogène

Les manifestations pathologiques dues à *S. aureus* sont très nombreuses :

Les suppurations localisées :

- Les infections cutanées : furoncle, abcès, panaris, anthrax, impétigo, staphylococcie maligne de la face, syndrome de la peau ébouillantée.
- Les infections ORL diverses : sinusites, otites, mastoïdites.
- Les infections des séreuses : arthrite, pleurésie, péritonite.
- Les infections osseuses : ostéomyélite, infection sur prothèse.
- Les infections viscérales : abcès du poumon, abcès du cerveau, phlegmon péri néphrétique.

Les manifestations digestives.

- Les toxi-infections alimentaires.
- Les entérocolites staphylococciques.

Les septicémies et les endocardites.

Le syndrome de choc toxique (20).

I-III-2-3- Micrococcus luteus

I-III-2-3-1- Caractère bactériologique

Micrococcus luteus est une bactérie sphérique de 0,5 à 3,5 μm de diamètre, immobile, ubiquitaire, à Gram positif formant des amas irréguliers, parfois des tétrades. Elle est généralement anaérobie stricte et peut réduire le nitrate en nitrite (24).

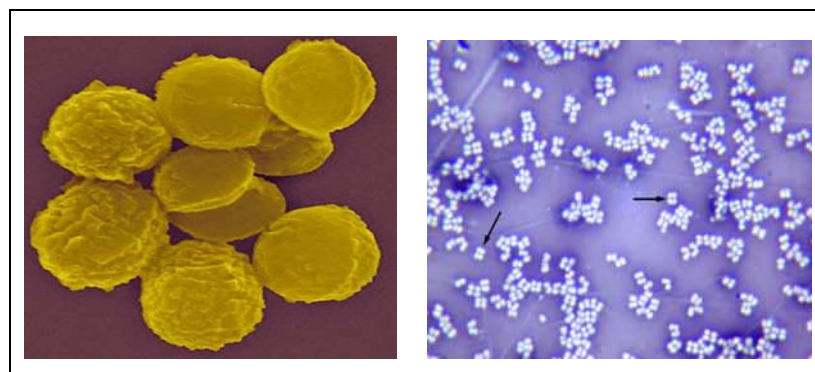


Figure I-7 : *Micrococcus luteus* (26)

I-III-2-3-2- Habitat

Très fréquent dans le sol, souvent comme germe procaryote majoritaire, *Micrococcus luteus* est présent dans tous les types de sols, l'air, les eaux, les poussières et dans des lieux jusqu'à très acides ou à forte salinité. Il a été également isolé sur la peau de l'homme et d'animaux, où il fait partie de la flore, ainsi que dans les produits laitiers et la bière (24,27).

I-III-2-3-3- Pouvoir pathogène

Bien que *Micrococcus luteus* soit un germe non pathogène et qu'il cause rarement des infections, il est considéré comme pathogène immergeant opportuniste des patients immunodéprimés.

Les patients avec un système immunitaire compromis présentent des infections cutanées chroniques, choques et arthrites septiques, endocardites, méningites et des pneumonies causées par *Micrococcus luteus* (28).

I-III-2-4- Listeria monocytogenes

I-III-2-4-1- Caractère bactériologique

Listeria monocytogenes est un petit bacille à Gram positif, de 0,5 à 2 µm de long sur 0,4 à 0,5 µm de diamètre. Aérobie-anaérobie facultative, asporulé et acapsulé, il est immobile à 37°C mais mobile en tourbillons et pirouettes à 20-25°C (ciliature péritriche), des amas palissadiques caractérisent l'individu (24).

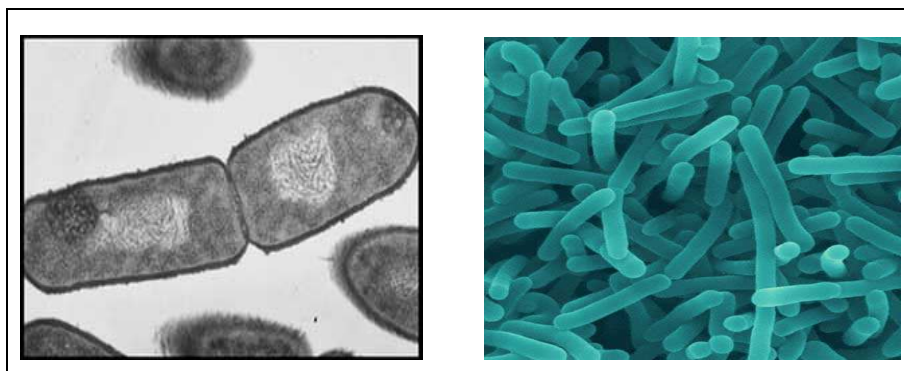


Figure I-8 : *Listeria monocytogenes* (29)

I-III-2-4-2- Habitat et épidémiologie

L. monocytogenes est une bactérie ubiquitaire. Elle est retrouvée sur des végétaux, dans le sol, dans l'eau. On a pu l'isoler des selles de très nombreuses espèces animales (20).

I-III-2-4-3- Pouvoir pathogène

L. monocytogenes est un pathogène intracellulaire facultatif, capable de se multiplier dans les macrophages et dans la plupart des cellules des tissus de l'hôte.

Listériose de l'adulte : forme méningée ou septicémique.

Listériose de la femme enceinte : Entraînant un accouchement prématuré.

Listériose du nouveau-né (20).

I-III-2-5- Enterococcus faecalis

I-III-2-5-1- Caractère bactériologique

Enterococcus faecalis est une bactérie à Gram positif, constituée de cocci ovoïdes, disposés par paires ou en chaînettes, et appartenant au genre Enterococcus.

Il se présente comme un microorganisme non-mobile, anaérobie facultatif, il fermente le glucose sans production de gaz (24).

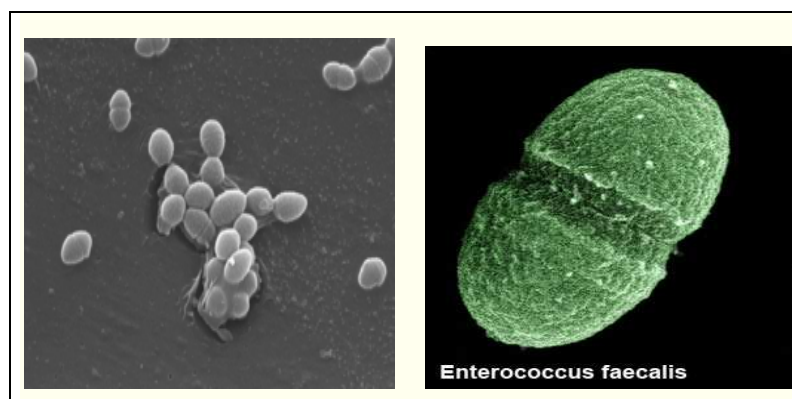


Figure I-9 : *Enterococcus faecalis* (30,31)

I-III-2-5-2- Habitat

Les entérocoques dont *E. faecalis*, sont des bactéries intestinales, trouvées chez l'homme et les animaux. Ils sont également présents sur les muqueuses génitales et sont plus accessoirement retrouvés dans l'oropharynx et sur la peau. Résistants à des conditions hostiles, ils peuvent être trouvés dans l'environnement, dans la poussière, sur les végétaux et dans l'eau, où leur présence est le témoin d'une contamination fécale (20).

I-III-2-5-3- Pouvoir pathogène

E. faecalis est l'espèce la plus souvent rencontrée chez l'homme. Avec *E. faecium* elles représentent 90% des isolats.

Les entérocoques sont responsables d'infections urinaires, de bactériémies et de cas d'endocardites bactériennes.

Les entérocoques sont fréquemment associés à d'autres espèces bactériennes, notamment des anaérobies, dans des infections pluri microbiennes : péritonites, infections des voies biliaires, suppuration post-chirurgicales (20).

I-III-2-6- Klebsiella pneumoniae

I-III-2-6-1- Caractère bactériologique.

Klebsiella pneumoniae est le principal représentant du genre des Klebsiella. Gros bacille à Gram négatif, en forme de bâtonnet court de 1 à 2 μm sur 0,3, il est polymorphe, parfois cocciforme, immobile, entouré d'une capsule et appartient à la famille des Enterobacteriaceae (24).

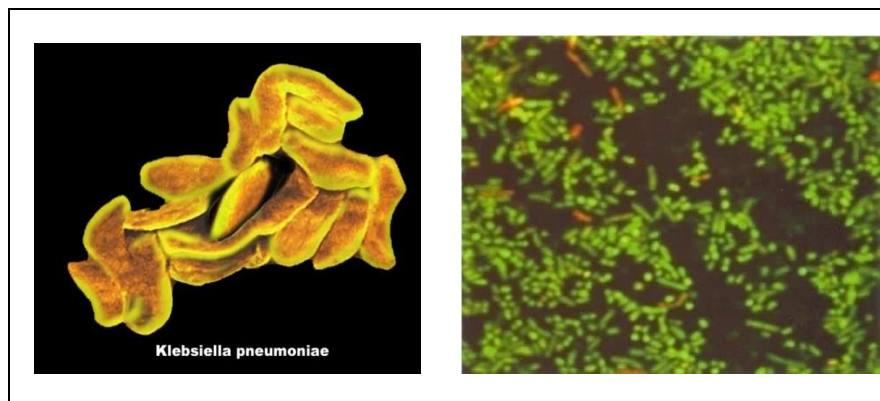


Figure I-10 : *Klebsiella pneumoniae* (32)

I-III-2-6-2- Habitat et épidémiologie

Les Klebsiella sont très répandues dans la nature. On les trouve dans l'eau, le sol, la poussière. Ce sont aussi des bactéries commensales du tube digestif de l'homme et animaux (20).

I-III-2-6-3- Pouvoir pathogène.

Les Klebsiella dont l'espèce la plus fréquemment isolée est *K. pneumoniae* sont responsables d'infections opportunistes chez des malades hospitalisés : Infections broncho-pulmonaires en réanimation qui évoluent parfois sur un mode épidémique.

Infections urinaires souvent consécutives à des manœuvres instrumentales.

Infections généralisées (septicémies ou bactériémies), qui peuvent être responsables d'un choc endotoxinique. Le taux de mortalité est alors élevé.

Infections méningées post-traumatiques ou post-chirurgicales (20).

I-III-2-7- Pseudomonas aeruginosa

I-III-2-7-1- Caractère bactériologique.

Pseudomonas aeruginosa a les caractères généraux des Pseudomonaceae ; bâtonnet à Gram négatif de 1,5 µm sur 0,5, aérobic strict, mobile par un flagelle polaire et dépourvue de spore et de capsule.

L'une des caractéristiques de l'espèce *P. aeruginosa* est la production d'un pigment bleu-vert ou pyocynine (24).

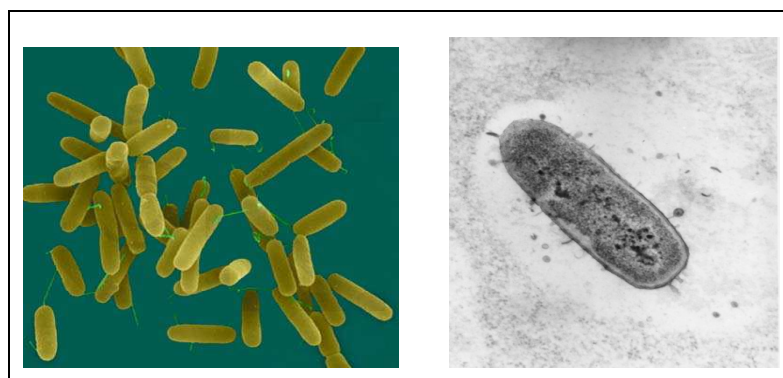


Figure I-11 : *Pseudomonas aeruginosa* (33)

I-III-2-7-2- Habitat

P. aeruginosa est une bactérie répandue dans la nature. Il vit dans l'eau et sur le sol. On le trouve aussi dans l'environnement hospitalier, surtout dans les endroits humides. Elle fait partie de la flore de transit de l'homme (20).

I-III-2-7-3- Pouvoir pathogène

P. aeruginosa est une bactérie pathogène opportuniste. Les infections concernent surtout les malades ayant une maladie grave sous-jacente, hémopathie ou cancer.

Les brûlés sont particulièrement sensibles à ces infections.

Au cours de la mucoviscidose, les voies aériennes sont très souvent colonisées par des souches muqueuses, contribuant à dégrader la fonction respiratoire.

P. aeruginosa peut aussi être responsable d'infections chez des sujets immunocompétents : folliculites ou otites acquises dans des piscines, infections oculaires après traumatisme (lentilles), ostéomyélite chez l'enfant, endocardites chez les drogués (20).

I-III-2-8- Généralité sur le genre Salmonella

I-III-2-8-1- Caractère bactériologique

Les bactéries du genre *Salmonella* appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae*. Ce sont des bacilles à Gram négatif, très mobiles par ciliature péritriche. Elles se présentent sous forme de bâtonnet droit de 0,6 à 0,8 µm de long, parfois à coloration bipolaire, aérobie-anaérobie facultatif (24).



Figure I-12 : *Salmonella typhimurium* (34)

I-III-2-8-2- Habitat

Les *Salmonella* sont des parasites du tube digestif de l'homme et des animaux. Elles sont retrouvées dans le milieu extérieur, dans les eaux d'égouts en particulier. Des *Salmonella* sont aussi fréquemment retrouvées dans les farines ou poudres d'os utilisées pour l'alimentation des animaux (20).

I-III-2-8-3- Pouvoir pathogène

Les salmonelloses peuvent revêtir deux aspects :

Les formes purement digestives : toxi-infections, gastro-entérites.

Les formes extra-digestives : cholécystite, méningite, ostéomyélite, spondylodiscite, glomérulonéphrite, atteinte pulmonaire (20).

I-III-3- Levures étudiées

I-III-3-1- Candida albicans

Candida albicans est l'espèce de levure la plus importante et la plus connue du genre *Candida*. Elle se présente sous forme de cellules ovales ou rondes de 3 à 5 μm de diamètre, non sporulées, bourgeonnantes, parois minces.

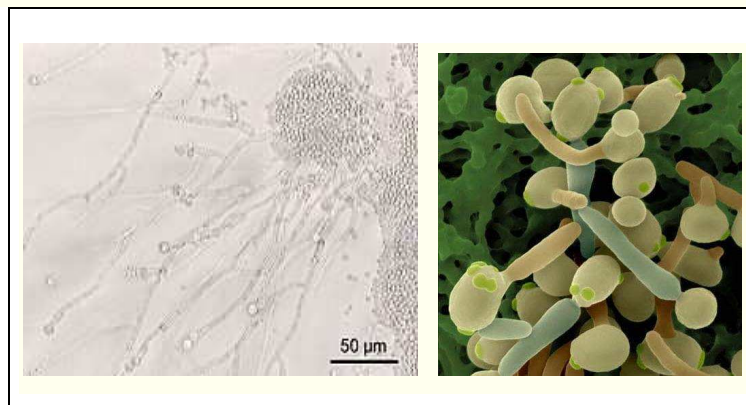


Figure I-13 : *Candida albicans* (35)

Organisme vivant à l'état naturel sur la peau, dans la bouche et le tube digestif de l'être humain (24), *Candida albicans* est une levure saprophytes des

muqueuses, qui en diverses occasions (modification du pH local, déséquilibre de la flore banale par antibiothérapie), peut devenir pathogène. Les manifestations sont très variables : cutanées, digestives, pulmonaires, urinaire, cardiaques, au niveau des muqueuses (muguet) et parfois provoque des septicémies graves (36).

I-III-3-2- Saccharomyces cerevisiae

Saccharomyces cerevisiae, appelée « levure de boulanger » ou « levure de bière », est une levure (cellule eucaryote, levure ascosporegène) formant des cellules libres et ovalaires de 1 à 6 µm de large pour 7 à 50 µm de long.

Elle forme 1 à 4 spores, peut assimiler 95% de sucre (glucose) selon l'unique voie de la glycolyse en anaérobiose. Son activité fermentaire est maximale à pH compris entre 4,5 et 5 (24).

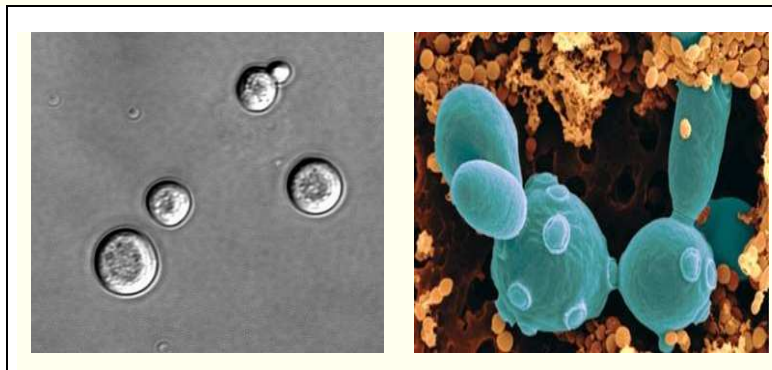


Figure I- 14 : *Saccharomyces cerevisiae* (37)

I-III-4- Moisissures étudiées

I-III-4-1- Aspergillus niger

Aspergillus niger, champignon Ascomycète, est une moisissure à thalle mycélien cloisonné dont les nombreux conidiphores dressés et non ramifiés, sont souvent terminés en vésicules. Contaminant banal et très répandu, cette moisissure est porteuse de conidies (24).



Figure I-15 : *Aspergillus niger* (38)

La multiplication d'*Aspergillus niger* chez l'homme entraîne l'aspergillose. La maladie est cosmopolite, l'aspergillus se trouvant sur de nombreux végétaux et parasitant de nombreux animaux. L'homme est contaminé par inhalation du champignon ou par inoculation par piqûre. L'aspergillose est surtout une maladie pulmonaire, survenant d'emblée ou secondaire à une lésion préexistante (36).

I-III-4-2- Rhizopus stolonifer

Rhizopus stolonifer est une moisissure (Zygomycètes) Mucorale du sol (cultivé essentiellement) et de nombreux milieux des régions tempérées dont la croissance du thalle est particulièrement rapide. Elle forme des stolons ; sporanges sphériques dressés ; spores rondes ; rhizoïdes.

Rhizopus stolonifer est un agent de toxicoses, il donne aux produits alimentaires colonisés un aspect cotonneux parsemés de sporanges noirs (16).

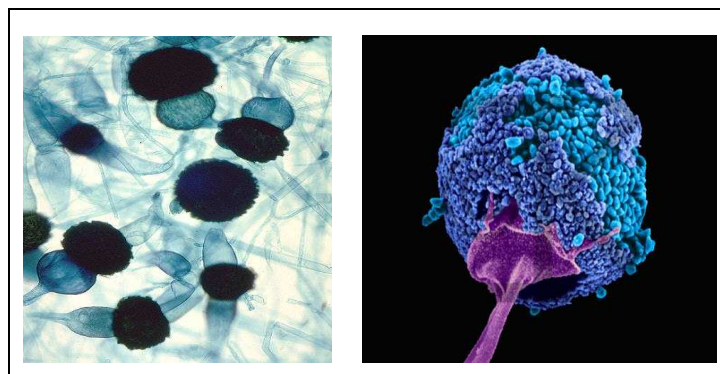


Figure I-16 : *Rhizopus stolonifer* (39)

Chapitre I-IV : Activité antimicrobienne

I-IV-1- Activité antibactérienne

I-IV-1-1- Sensibilité et résistance

Une espèce bactérienne peut être résistante à un agent antibactérien, du fait de sa structure cellulaire ou de son métabolisme. On parle alors de résistance naturelle ou constitutionnelle et la souche est qualifiée de sauvage car non modifiée. Les bactéries peuvent également acquérir des moyens nouveaux pour résister à l'action de tel ou tel agent. On parle alors de résistance acquise. Les propriétés de résistances sont génétiquement déterminées par des gènes de résistance naturels ou acquis. Ces gènes ne s'expriment que lorsque les conditions de l'environnement (in vitro ou in vivo) le permettent (20).

I-IV-1-2- Aromatogramme

L'aromatogramme est à la phytothérapie ce que l'antibiogramme décrit par la pharmacopée française des antibiotiques est à la médecine ». Cette transposition due au Dr Girault dès 1971, est décrite dans le tome III du Traité de Phytothérapie et d'Aromathérapie (40).

L'aromatogramme est basée sur une technique utilisée en bactériologie médicale, appelée antibiogramme ou méthode par diffusion en milieu gélosé. Cette méthode a l'avantage d'être d'une grande souplesse dans le choix des antibiotiques testés, de s'appliquer à un très grand nombre d'espèces bactériennes, et d'avoir été largement évaluée par 50 ans d'utilisation mondiale (20) .

I-IV-1-2-1- Méthode des disques

Pour réaliser l'aromatogramme par la méthode des disques, la culture bactérienne est effectuée à la surface d'une gélose. Des disques préimprégnés d'une dose connue d'huile essentielle sont déposés à la surface de la gélose. L'huile essentielle diffuse à partir du disque en créant un gradient de concentration. La détermination du diamètre de la zone d'inhibition permet une

estimation de la concentration minimale inhibitrice. Les caractères de sensibilité ou de résistance de la souche bactérienne en seront déduits.

A partir du disque, il est possible de formaliser les mécanismes de la façon suivante :

Soit q la quantité d'huile essentielle contenue dans le disque, d son diamètre et h la hauteur de la colonne de gélose sous le disque. La diffusion de l'huile essentielle peut être théoriquement séparée en deux temps : diffusion verticale et diffusion horizontale

Diffusion verticale :

Diffusion verticale de l'huile essentielle donne, dans un premier temps, une concentration de départ C_i dans un cylindre délimité par le disque.

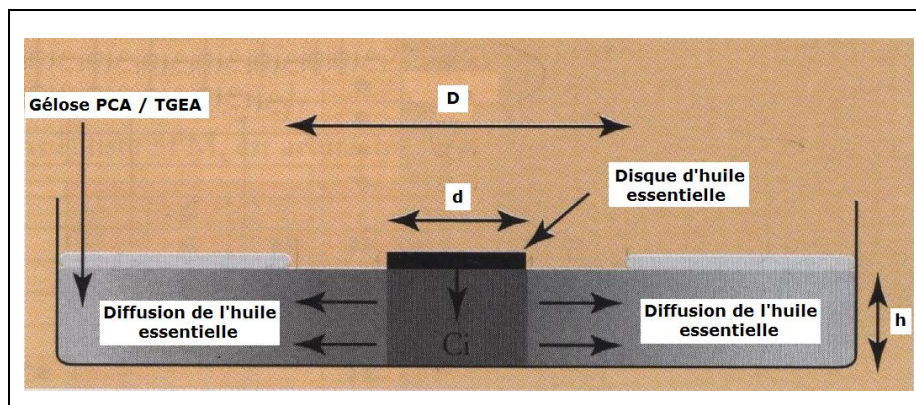


Figure I-17 : Diffusion de l'huile essentielle dans la gélose à partir du disque imbibé (41).

C_i dépend donc de la charge du disque et de la hauteur de la plaque de gélose. Diamètre et charge du disque sont normalisés et doivent être identiques.

Diffusion horizontale :

Une diffusion horizontale donne un gradient de concentration dont le maximum se situe au niveau du disque. Cette diffusion se fait à une certaine vitesse.

La technique doit être standardisée pour être reproductible. On notera en particulier l'importance, pour le technicien au laboratoire, de la hauteur de la gélose s'il réalise le coulage des boîtes (41).

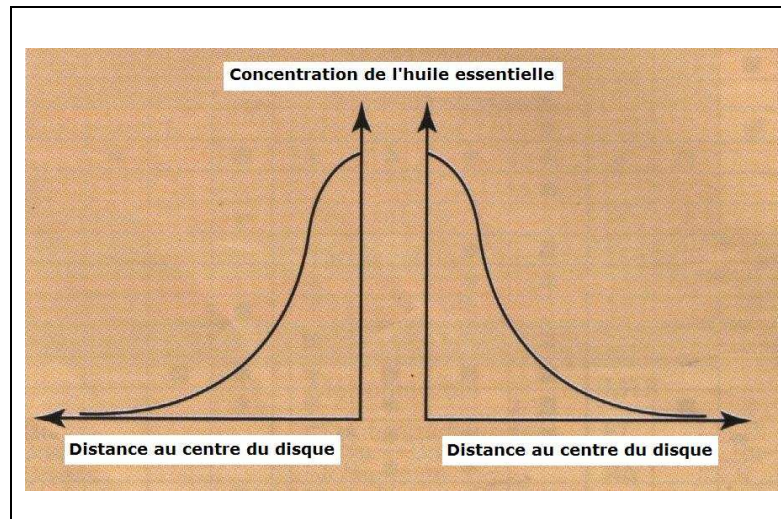


Figure I-18: Profile de diffusion de l'huile essentielle dans la gélose (41).

I-IV-1-2-1- Méthode des puits :

L'aromatogramme par la méthode des puits est analogue à la méthode des disques lors de la phase d'ensemencement des germes, la différence entre ces deux méthodes subsiste dans le mode de diffusion.

Pour réaliser l'aromatogramme par la méthode des puits, il faut aménager des cavités dans la gélose dont la surface a étéensemencée et séchée. Les puits ainsi formés sont remplis avec une quantité précise d'huile essentielle en évitant tout débordement à la surface. Cette quantité d'huile essentielle se propagera dans la gélose donnant un gradient de concentration suivant une diffusion horizontale, contrairement à la méthode des disques qui est caractérisée par une diffusion en deux temps (verticale puis horizontale).

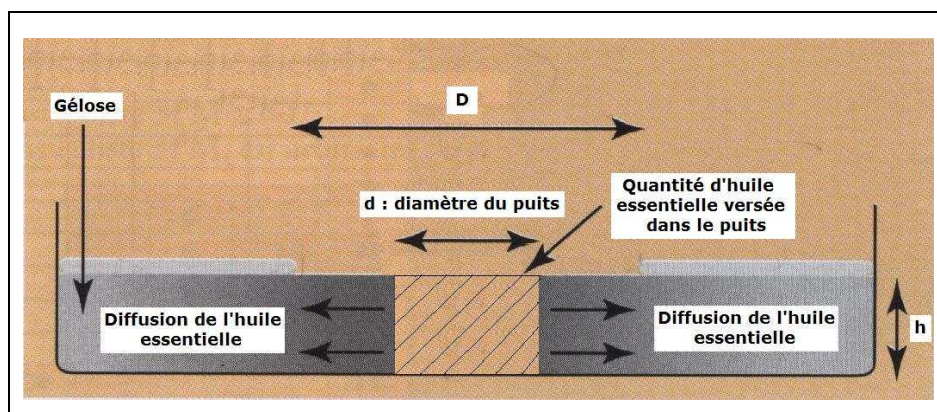


Figure I-19 : Diffusion de l'huile essentielle dans la gélose à partir du puits (41).

I-IV-1-3- Bactéricidie

La bactéricidie est l'activité d'une huile essentielle qui entraîne la mort des bactéries. Elle est fonction de la concentration en huile essentielle et de sa durée d'action (42).

I-IV-1-4- Bactériostase

La bactériostase est la diminution de la croissance bactérienne sans mort cellulaire. Lorsque cette activité est maximale, le nombre de bactéries reste égal à celui de l'inoculum (42).

I-IV-1-5- Paramètres de l'activité in vitro des huiles essentielles :

I-IV-1-5-1- Concentration minimale inhibitrice CMI

La Concentration Minimale Inhibitrice (**CMI**) est la concentration d'huile essentielle la plus faible à laquelle il n'y a pas de croissance visible. Ainsi la CMI est la concentration d'huile essentielle dans le premier tube ne présentant pas de croissance visible. C'est le paramètre le plus souvent utilisé car c'est avec lui que les corrélations cliniques ont été les mieux établies (20, 42).

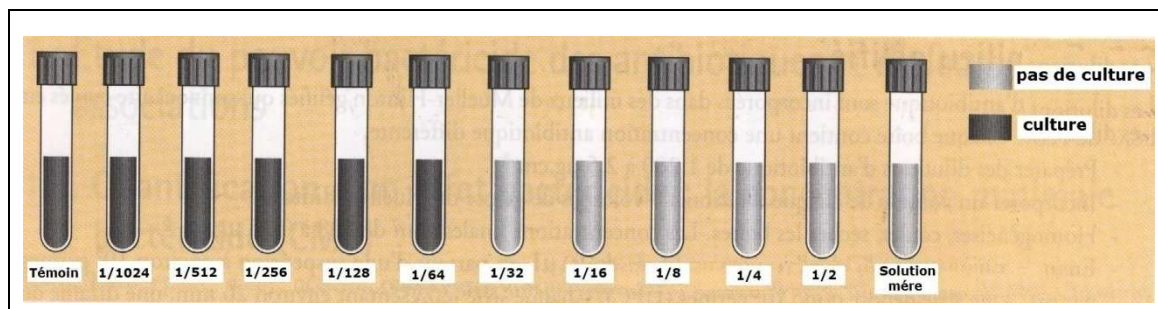


Figure I-20 : Exemple de lecture de CMI (41).

I-IV-1-5-3- Concentration minimale inhibitrice CMB

La Concentration Minimale Bactéricide (**CMB**) est la concentration d'huile essentielle la plus faible à laquelle il n'y a que 0,1 ou 0,01 % de bactéries survivantes (42).

I-IV-1-5-4- Rapport CMB/CMI

Ce rapport peut être utilisé pour distinguer les huiles essentielles bactéricides ($CMB/CMI \leq 2$), des huiles essentielles bactériostatiques (CMB très éloignée de la CMI). Il définit également la tolérance d'une souche. La souche est dite tolérante quand ce rapport est ≥ 32 (20).

I-IV-1-6- Cinétique de bactéricidie

C'est une épreuve dynamique qui tente de prendre en compte le facteur temps négligé par les autres paramètres de bactéricidie. Ces cinétiques sont déterminées grâce à des méthodes lourdes mais qui deviendront possibles grâce à l'automatisation. Les résultats exprimés graphiquement permettent notamment de discriminer les huiles essentielles temps-dépendants et concentrations-dépendants (20).

I-IV-2- Activité antifongique

Les antifongiques, antifungiques ou fongicide sont des produits qui possèdent la capacité de tuer les champignons, donc se caractérisent par une activité antifongique. Les fongistatiques sont également considérés comme des antifongiques à la limite près qu'ils ne détruisent pas les champignons mais limitent leur développement.

Les antifongiques sont utilisés pour traiter les mycoses c'est-à-dire les infections par des champignons microscopiques. Ils sont également utilisés en alimentation pour inhiber le développement mycélien.

Le terme de fongicides est davantage réservé aux produits phytosanitaires de traitement des plantes, des cultures et des récoltes (24,43).

I-IV-3- Association d'huiles essentielles

I-IV-3-1- Synergie

La synergie est l'effet bactériostatique ou bactéricide d'une association d'huile essentielle supérieure à celui de la simple addition des effets de chacun des isolés (42).

I-IV-3-2- Addition

On se trouve en présence d'effet d'addition, lorsque l'activité d'une association d'huile essentielle est égale à la somme des effets de chaque huile essentielle étudiée isolément à la même concentration que dans l'association (42).

I-IV-3-3- Antagonisme

On se trouve en présence d'effet d'antagonisme, lorsque l'activité d'une association d'huile essentielle est inférieure à la somme des effets de chaque huile essentielle étudiée isolément à la même concentration que dans l'association. L'association diminue l'activité d'une des huiles essentielles (42).

Partie II :
MATERIEL ET METHODES

Partie II : Matériel et méthodes

Chapitre II-I : Huiles essentielles

Le travail effectué a porté sur la détermination du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles suivantes :

- L'huile essentielle d'orange.
- L'huile essentielle de lavande.
- L'huile essentielle de thym.
- L'huile essentielle de romarin.

Préparation des huiles essentielles

Les huiles essentielles étant insolubles dans les milieux aqueux, elles ont été solubilisées dans un solvant pour permettre leur ajout dans les bouillons nutritifs.

Le solvant utilisé est l'éthanol, au volume d'huile essentielle a été ajouté progressivement des volumes d'éthanol afin d'obtenir une miscibilité totale avec un volume minimal de solvant.

La solution ainsi obtenue représente la solution mère. Cette solution est diluée en série avec le même solvant suivant une progression géométrique de raison $\frac{1}{2}$ pour donner la gamme d'huile essentielle.

Chapitre II-II : Etude de l'activité antimicrobienne

II-II-1- Souches microbiennes

L'étude de l'activité antimicrobienne a porté sur les souches bactériennes et des souches fongiques suivantes:

- *Escherichia coli* ATCC 25922.
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
- *Micrococcus luteus* ATCC 1533.
- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.
- *Listeria monocytogenes* IPA32.
- *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.
- *Salmonella enteritidis* ATCC 13076.
- *Candida albicans* IPA7.
- *Saccharomyces cerevisiae* LSTE1.
- *Aspergillus niger* LSTE22.
- *Rhizopus stolonifer* LSTE15

Les souches sont fournies par l'Institut Pasteur d'Alger sauf pour *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger* et *Rhizopus stolonifer* (souches de la collection du laboratoire de Sciences et Techniques de l'Environnement de l'ENP). Elles sont conservées au réfrigérateur à une température de 4°C sur gélose inclinée de conservation.

II-II-2- Détermination de la sensibilité des bactéries aux extraits végétaux « aromatogramme »

II-II-2-1- Méthode des disques

Matériel :

Huile essentielle miscible dans l'éthanol.

Disques en papier filtre de 6 mm de diamètre stérilisés.

Gélose Plat Count Agar (PCA) coulée dans des boîtes de Pétri (4 mm de hauteur). La composition du milieu est portée en annexe 2.

Bouillon bactérien (préculture) des souches étudiées. La composition du milieu est porté en annexe 1.

Protocole :

La densité de la biomasse des bouillons bactériens a été déterminée au moyen d'un spectrophotomètre (UV-Visible) en mesurant l'absorbance à une longueur d'onde de 600 nm, en se référant à un blanc ne contenant que le milieu de culture.

Les surfaces des géloses ont étéensemencées avec l'inoculum, ce volume a été étalé à l'aide d'un râteau de manière à avoir une répartition uniforme. Après une période de 15 minutes nécessaire pour obtenir une surface sèche, les disques de papier imbibés de la solution d'huile essentielle sont disposés sur la surface de la gélose à l'aide d'une pince. Pour chaque souche bactérienne, une culture témoin est réalisée en déposant un disque imbibé d'éthanol. Les boîtes sont ensuite incubées à l'étuve à 37°C pendant 48h.

Le diamètre de la zone d'inhibition détermine la catégorie de sensibilité de la bactérie envers l'huile essentielle. Les résultats sont exprimés selon trois niveaux d'activité :

- Résistant : $D = 6 \text{ mm}$.
- Intermédiaire : $6 \text{ mm} \leq D \leq 13 \text{ mm}$.
- Sensible : $D > 13 \text{ mm}$ **(45)**.

II-II-2-2- Méthode des puits

Matériel :

Huile essentielle miscible dans l'éthanol.

Gélose Plat Count Agar (PCA) coulée dans des boîtes de Pétri

Bouillon bactérien des souches étudiées.

Protocole :

La densité de la biomasse des bouillons bactériens a été déterminée de la même manière que dans le protocole précédant.

Les surfaces des géloses ont étéensemencées de la même manière que précédemment. Après une période de 15 minutes nécessaire pour obtenir une surface sèche, des puits de 6 mm de diamètre ont été creusés au centre de chaque boîte au moyen d'une pipette Pasteur. Ces puits sont ensuite remplis avec la solution d'huile essentielle. Pour chaque souche bactérienne, une culture témoin est réalisée en remplissant le puits avec l'éthanol. Les boîtes sont ensuite incubées à l'étuve à 37°C pendant 48h.

L'estimation de l'activité antimicrobienne est basée sur une échelle de mesure qui classe le pouvoir antimicrobien, en fonction des diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne, en 04 classes :

- Fortement inhibitrice : $D > 28$ mm.
- Modérément inhibitrice : $16 < D < 28$ mm.
- Légèrement inhibitrice : $10 < D < 16$ mm.
- Non inhibitrice : $D < 10$ mm **(46)**.

II-II-3- Détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI et de la concentration minimale bactéricide CBM

La détermination de la CMI et CMB s'est faite suivant un protocole utilisé par la pharmacopée Française pour l'étude de l'activité des antibiotiques. Ce protocole a été adapté pour permettre l'étude des huiles essentielles (42).

Protocole :

1^{er} Jour

La densité de la biomasse de la culture en phase exponentielle préparée a été déterminée suivant le protocole cité précédemment.

L'inoculum est ensuite dilué au dixième dans du bouillon nutritif préalablement réchauffé à 37°C. Les tubes à hémolyse contenant le bouillon nutritif sont inoculés.

Pour mesurer la CMB, un dénombrement des bactéries du tube témoin a été réalisé. Le tube témoin et chaque dilution sont ensuiteensemencés sur la surface d'une gélose bien sèche, en stries.

Les boîtes témoin et les tubes sont incubés 24 h à 37°C.

2^e Jour

Lecture de la CMI se fait en déterminant la concentration d'huile essentielle la plus faible pour laquelle il n'y a pas de culture visible.

3^e jour

Une comparaison entre la densité de chaque strie des boîtes ensemencées à partir des tubes restés clairs avec celle des stries obtenues sur les boîtes témoins est réalisée.

Si la densité est comparable à celle obtenue avec le tube témoin :

- Pur, il y a 100 % de survivants ;
- Dilué au 1/10, il y a 10 % de survivants ;
- Dilué au 1/100, il y a 1 % de survivants ;
- Dilué au 1/1000, il y a 0,1 % de survivants ;
- Dilué au 1/10000, il y a 0,01 % de survivants.

La CMB est définie par la concentration ne laissant persister que 0,1 % de survivants au plus (42).

II-II-4- Cinétique de l'activité antibactérienne

La cinétique de bactéricidie des huiles essentielles est déterminée en dénombrant à intervalles de temps définis les bactéries survivantes cultivées en présence d'huile essentielle. Un ou deux prélèvements réalisés à la 24^e ou à la 48^e heure permettent de caractériser la phase tardive.

Matériel :

Gamme d'huile essentielle.

Tubes à hémolyse stériles.

Gélose en fusion.

Protocole :

1^{er} jour

La densité de la biomasse de la culture en phase exponentielle préparée a été déterminée suivant le protocole cité précédemment.

L'inoculum est ensuite dilué au dixième dans du bouillon nutritif préalablement réchauffé à 37°C.

Un volume de 9 ml de la suspension bactérienne est réparti dans un nombre de tubes égal au nombre de concentrations d'huile essentielle étudiées additionnée d'un tube témoin.

A partir du tube témoin, un dénombrement de l'inoculum est réalisé en effectuant des dilutions sériées de 10 en 10. Puis un volume de 0,1 ml de ces dilutions est ensemencé en profondeur.

Les tubes sont placés à 37°C. Selon la périodicité choisie, les dénombrements ultérieurs sont effectués de façon identique ou dénombrement initial. Les boîtes obtenues sont incubées 24 h à 37°C.

2^e jour

Les colonies apparues sont comptées. La concentration bactérienne par millilitre s'obtient en multipliant le résultant par 10 et par le facteur de dilution utilisé. Seules les boîtes présentant un nombre de colonies compris entre 30 et 300 sont prises en compte (42).

II-II-5- Détermination de la sensibilité des souches fongiques aux extraits végétaux

La détermination de la sensibilité aux extraits végétaux a été effectuée par la méthode des puits, le protocole utilisé est analogue à celui décrit dans le paragraphe II-2-1 de l'étude de l'activité antimicrobienne.

Après 72 heures d'incubation à l'étuve et à température de 30°C. Les spores formées ont été récoltées à l'aide d'une anse et mis en suspension dans du bouillon YM. Cette suspension a servi d'inoculum.

Partie III :
RESULTATS ET DISCUSSIONS

Partie III : Résultats et discussions

Chapitre III-I - Etude de l'activité antibactérienne

L'étude des huiles essentielles d'orange douce, de lavande, de thym et de romarin a initialement porté sur une évaluation de l'activité antibactérienne. Le test de sensibilité effectué par la réalisation d'un aromatoگرامme soit par méthode des disques ou par celle des puits a permis de mesurer les diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne causée par la présence de l'huile essentielle.

Au terme de ce test, nous classons les bactéries suivant leur degré de sensibilité en différentes catégories. Cette classification servira de référence pour réaliser une sélection des souches présentant une sensibilité importante pour la détermination des paramètres de l'activité antibactérienne. Ainsi pour les souches choisies, une détermination de la CMI et CMB sera effectuée.

III-I-1 – Huile essentielle d’orange :

L’huile essentielle d’orange douce étudiée, a été testée sur les souches bactériennes en adoptant la méthode des puits. Les mesures des diamètres des zones d’inhibition sont portées dans le tableau III-1 ainsi que les catégories d’inhibition relative à chaque bactérie.

Tableau III-1 : Résultats du test de sensibilité à l’H.E d’orange et catégorie d’inhibition (Méthode des puits)

| Souche bactérienne | Diamètre moyen d’inhibition (mm) | Catégorie d’inhibition |
|-------------------------------|--|------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | 8,00±1.41 | Non inhibitrice |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Absence de halo d’inhibition (6,00±0,00) | Non inhibitrice |
| <i>Micrococcus luteus</i> | 6,16±0,23 | Non inhibitrice |
| <i>Salmonella typhimurium</i> | 8,66±2,05 | Non inhibitrice |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | 7,00±0,81 | Non inhibitrice |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 8,33±0,62 | Non inhibitrice |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Absence de halo d’inhibition (6,00±0,00) | Non inhibitrice |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | Absence de halo d’inhibition (6,00±0,00) | Non inhibitrice |
| <i>Salmonella enteritidis</i> | Absence de halo d’inhibition (6,00±0,00) | Non inhibitrice |

Les diamètres des zones d’inhibition étant compris entre 8,66±2,05 mm et 6,00±0,00 mm, il apparaît clairement que l’huile essentielle d’orange douce ne possède pas d’activité antibactérienne vis-à-vis des souches testées. Les diamètres étant inférieurs à 10 mm, l’huile est considérée comme non inhibitrice. Les huiles essentielles d’orange sont composées en grande majorité de Limonène, arôme caractéristique de l’orange.

III-I-2 – Huile essentielle de lavande :

III-I-2-1 – Evaluation de l'activité antimicrobienne :

L'étude de l'huile essentielle de lavande a été réalisée en effectuant l'aromatogramme par les deux méthodes : disques et puits.

Les mesures des diamètres des zones d'inhibition ainsi que les catégories d'inhibition sont portées dans le tableau III-2 pour la méthode des disques et dans le tableau III-3 pour celle des puits.

Tableau III-2 : Résultats du test de sensibilité à l'H.E de lavande et catégorie d'inhibition (Méthode des disques)

| Souche bactérienne | Diamètre moyen d'inhibition (mm) | Catégorie d'inhibition |
|-------------------------------|--|------------------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 8,00±0,00 | Intermédiaire |
| <i>Micrococcus luteus</i> | 9,50±0,50 | Intermédiaire |
| <i>Salmonella typhimurium</i> | 8,75±0,25 | Intermédiaire |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | Absence de halo d'inhibition (6,00±0,00) | Résistant |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 7,00±0,00 | Intermédiaire |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Absence de halo d'inhibition (6,00±0,00) | Résistant |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | 7,25±0,2 | Intermédiaire |
| <i>Salmonella enteritidis</i> | 6,25±0,25 | Résistant |

Tableau III-3 : Résultats du test de sensibilité à l’H.E de lavande et catégorie d’inhibition (Méthode des puits)

| Souche bactérienne | Diamètre moyen d’inhibition (mm) | Catégorie d’inhibition |
|-------------------------------|----------------------------------|------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | 11,50±0,50 | Légèrement inhibitrice |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 19,00±2,00 | Modérément inhibitrice |
| <i>Micrococcus luteus</i> | 20,50±0,50 | Modérément inhibitrice |
| <i>Salmonella typhimurium</i> | 14,00±0,00 | Légèrement inhibitrice |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | 11,50±0,50 | Légèrement inhibitrice |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 12,50±0,50 | Légèrement inhibitrice |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 9,50±0,50 | Non inhibitrice |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | 13,50±0,50 | Légèrement inhibitrice |
| <i>Salmonella enteritidis</i> | 16,50±0,50 | Modérément inhibitrice |

Les diamètres des zones d’inhibition obtenus en adoptant la méthode des disques sont compris entre 7,00±0,00 et 9,50±0,50, ce qui permet de dire que les souches bactériennes testées sont toutes de sensibilité intermédiaire à l’huile essentielle de lavande. A l’exception des deux souches *Salmonella enteritidis* et *Pseudomonas aeruginosa* qui présentent une résistance à l’huile, et de ce fait ont eu une croissance bactérienne normale sans apparition de zone d’inhibition.

Pour ce qui est des diamètres d’inhibition obtenus en adoptant la méthode des puits, ils sont quant à eux compris entre 11,50±0,50 et 20,50±0,50. Ce qui permet de dire que l’huile essentielle de lavande entraîne une inhibition moyenne

(modérée ou légère) sur les souches testées. La seule exception étant *Pseudomonas aeruginosa*, qui n'a pas été inhibée par l'huile en présentant un diamètre de zone d'inhibition inférieur à 10 mm. Cette bactérie a la réputation d'être très résistante à toute sorte d'agents antimicrobiens et antibiotiques (47).

La souche *Salmonella enteritidis* a montré une résistance à l'huile essentielle de lavande lors du test réalisé par la méthode des disques mais a été inhibée lors de celui réalisé par la méthode des puits. Cette différence peut être expliquée par la présence d'une concentration critique à partir de laquelle la souche est inhibée. Ce seuil n'ayant pas été atteint par la quantité d'huile essentielle présente dans le disque en papier, la bactérie a eu une croissance normale.

Les résultats obtenus lors de cette manipulation révèlent que l'huile essentielle de lavande possède une activité antibactérienne moyenne. Ce qui rejoint les résultats obtenus par **Kaloustian et al (48)** lors d'une étude portant sur l'activité de l'huile essentielle de lavande sur les deux souches *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.

III-I-2-1 – Détermination des paramètres de l'activité antimicrobienne :

Le choix des bactéries s'est porté sur toutes les souches mis à part *Pseudomonas aeruginosa*. La méthode utilisée concerne la détermination des CMI et CMB en milieu liquide décrite dans le chapitre, et dont les résultats obtenus sont résumés dans le Tableau III-4.

Tableau III-4 : Résultats de la détermination de la CMI et de la CMB pour l'H.E de lavande

| Souche bactérienne | CMI | CMB | Rapport CMB/CMI |
|-------------------------------|---------------|---|--|
| <i>Escherichia coli</i> | Dilution 1/16 | Dilution 1/8 | 2 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Dilution 1/32 | Dilution 1/8 | 4 |
| <i>Salmonella typhimurium</i> | Dilution 1/8 | Dilution 1/8 | 4 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | Dilution 1/16 | Croissance bactérienne observée pour toutes les dilutions | Le rapport ne peut être défini en absence de CMB |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | Dilution 1/8 | Dilution 1/4 | 2 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | Dilution 1/32 | Solution mère | 32 |
| <i>Salmonella enteritidis</i> | Dilution 1/32 | Dilution 1/4 | 8 |

^a : les concentrations sont données en μL d'H.E. par mL de milieu de culture.

Suite aux résultats de la détermination de la CMI, nous constatons que l'huile essentielle de lavande est plus efficace sur les souches *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* et *Salmonella enteritidis* qui présentent une inhibition à une concentration de $0,468 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^(a). Les souches *Escherichia coli* et *Enterococcus faecalis*, sont quant à elles inhibées a une concentration de $0,937 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^(a), tandis que *Klebsiella pneumoniae* et *Salmonella typhimurium* sont les moins sensibles à l'inhibition avec une CMI obtenue à une concentration de $1.875 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^(a).

En revanche les résultats de la détermination de la CMB montrent que l'huile essentielle possède un pouvoir bactéricide plus important sur *Escherichia*

coli et *Staphylococcus aureus*, avec une CMB obtenue à une concentration de $1.875 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1 (a)}$..

Ce pouvoir bactéricide est moins important pour *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enteritidis* (CMB = $3.750 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1 (a)}$.) et pour *Listeria monocytogenes* (CMB = $15.000 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1 (a)}$.). Pour *Enterococcus faecalis*, une croissance bactérienne a été observée pour les tous les tubes, ce qui indique que l'huile essentielle de lavande ne possède pas d'effet bactéricide sur cette souche.

Par ailleurs le calcul du rapport CMB/CMI indique que l'huile essentielle de lavande est bactéricide envers *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* (CMB/CMI ≤ 2), et bactériostatique envers *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* et *Salmonella enteritidis* ($2 < \text{CMB/CMI} < 32$). Par contre la souche *Listeria monocytogenes* est résistante à l'huile (CMB/CMI ≥ 32).

III-I-3 – Huile essentielle de romarin

III-I-3-1 – Evaluation de l'activité antimicrobienne

L'étude de l'huile essentielle de romarin a été réalisée en effectuant l'aromatogramme par les deux méthodes : disques et puits.

Les mesures des diamètres des zones d'inhibition ainsi que les catégories d'inhibition sont portées dans le tableau III-5 pour la méthode des disques et dans le tableau III-6 pour celle des puits.

La Figure III-3 regroupe les photos des cultures bactériennes en présence de disque imbibé l'huile essentielle et celles en présence des puits remplis.

Tableau III-5 : Résultats du test de sensibilité à l'H.E de romarin par la méthode des disques et catégorie d'inhibition.

| Souche bactérienne | Diamètre moyen d'inhibition (mm) | Catégorie d'inhibition |
|-------------------------------|--|-------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | Absence de halo d'inhibition (6,00±0,00) | Résistant |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Absence de halo d'inhibition (6,00±0,00) | Résistant |
| <i>Micrococcus luteus</i> | Absence de halo d'inhibition (6,00±0,00) | Résistant |
| <i>Salmonella typhimurium</i> | Absence de halo d'inhibition (6,00±0,00) | Résistant |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | Absence de halo d'inhibition (6,00±0,00) | Résistant |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | Absence de halo d'inhibition (6,00±0,00) | Résistant |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Absence de halo d'inhibition (6,00±0,00) | Résistant |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | Absence de halo d'inhibition (6,00±0,00) | Résistant |
| <i>Salmonella enteritidis</i> | Absence de halo d'inhibition (6,00±0,00) | Résistant |

Tableau III-6 : Résultats du test de sensibilité à l’H.E de romarin par la méthode des puits et catégorie d’inhibition.

| Souche bactérienne | Diamètre moyen d’inhibition (mm) | Catégorie d’inhibition |
|-------------------------------|--|------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | Zone d’inhibition dis forme de surface négligeable | Non inhibitrice |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 7,00±0,00 | Non inhibitrice |
| <i>Micrococcus luteus</i> | Absence de halo d’inhibition (6,00±0,00) | Non inhibitrice |
| <i>Salmonella typhimurium</i> | 7,75±0,25 | Non inhibitrice |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | 10,00±0,00 | Non inhibitrice |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 9,50±0,50 | Non inhibitrice |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Absence de halo d’inhibition (6,00±0,00) | Non inhibitrice |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | 13,50±0,50 | Légèrement inhibitrice |
| <i>Salmonella enteritidis</i> | 9,50±0,50 | Non inhibitrice |

Le test de l’aromatogramme effectué a révélé que l’huile essentielle de romarin ne possède pas d’activité antibactérienne vis-à-vis des souches testées.

Les résultats obtenus par la méthode des disques montrent une absence totale de zone d’inhibition, ce qui implique que les souches bactériennes sont toutes considérées comme résistantes à cette huile essentielle.

Ces résultats ont été confirmés lors de la réalisation de la deuxième méthode. La quantité d’huile essentielle en contact avec les bactéries étant plus importante (20 µl pour de la méthode des puits contre 5 µl pour celle des disques), on observe l’apparition d’une zone d’inhibition, mais qui reste de faible diamètre. Ce qui classe l’huile essentielle de romarin comme non inhibitrice

envers les souches testées à l'exception de *Listeria monocytogenes* qui a présenté une zone d'inhibition d'un diamètre de $13,50 \pm 0,50$ mm et ainsi a été légèrement inhibée par l'huile.

Des études réalisées sur l'huile essentielle de romarin font état de sa capacité inhibitrice ou bactéricide envers différentes souches bactériennes. Ces études attribuent à cette huile une activité antimicrobienne moyenne ou marquée.

L'étude réalisée par **Djeddi et al (49)**, qui porte sur l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* d'Algérie, révèle que les souches *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* sont très sensibles à l'huile extraite des tiges, feuilles et fleurs fraîches du romarin de la région d'Alger.

De même, l'étude réalisée par **Kaloustian et al (48)** portant sur l'huile essentielle extraite des sommités fleuries du romarin de France, attribue à l'huile une activité antimicrobienne moyenne.

III-I-4 – Huile essentielle de thym

III-I-4-1 – Evaluation de l'activité antimicrobienne

L'étude de l'huile essentielle de thym a été réalisée en effectuant l'aromatogramme par les deux méthodes : disques et puits.

Les mesures des diamètres des zones d'inhibition ainsi que les catégories d'inhibition sont portées dans le tableau III-7 pour la méthode des disques et dans le tableau III-8 pour celle des puits.

La Figure III-6 regroupe les photos des cultures bactériennes en présence de disque imbibé l'huile essentielle et celles en présence des puits remplis.

Tableau III-7 : Résultats du test de sensibilité à l'H.E de thym par la méthode des disques et catégorie d'inhibition.

| Souche bactérienne | Diamètre moyen d'inhibition (mm) | Catégorie d'inhibition |
|-------------------------------|--|-------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | 27,00±1,00 | Sensible |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 20,50±0,50 | Sensible |
| <i>Micrococcus luteus</i> | 24,50±3,50 | Sensible |
| <i>Salmonella typhimurium</i> | 22,50±3,50 | Sensible |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | 25,00±2,00 | Sensible |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 22,50±0,50 | Sensible |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Absence de halo d'inhibition (6,00±0,00) | Résistant |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | 17,50±0,50 | Sensible |
| <i>Salmonella enteritidis</i> | 22,00±1,00 | Sensible |

Tableau III-9 : Résultats du test de sensibilité à l’H.E de thym par la méthode des puits et catégorie d’inhibition

| Souche bactérienne | Diamètre moyen d’inhibition (mm) | Catégorie d’inhibition |
|-------------------------------|---|-------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | 34,00±1,00 | Fortement inhibitrice |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 28,50±6,50 | Fortement inhibitrice |
| <i>Micrococcus luteus</i> | 32,50±0,50 | Fortement inhibitrice |
| <i>Salmonella typhimurium</i> | 26,00±1,00 | Fortement inhibitrice |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | 29,50±0,50 | Fortement inhibitrice |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 26,50±0,50 | Modérément inhibitrice |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Absence de halo d’inhibition(6,00±0,00) | Non inhibitrice |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | 30,50±0,50 | Fortement inhibitrice |
| <i>Salmonella enteritidis</i> | 31,00±3,00 | Fortement inhibitrice |

Au terme de l’aromatogramme réalisé, les résultats obtenus, que ce soit par la méthode des disques ou celle des puits, montrent que l’huile essentielle de thym possède une forte activité antibactérienne.

Les diamètres des zones d’inhibition mesurés lors de la méthode des disques sont compris entre 17,50±0,50 mm et 27,00±1,00 mm, ce qui permet de considérer les souches testées comme sensibles, voir très sensibles à cette huile essentielle (seuil de sensibilité étant à 13 mm).

Les résultats de la seconde méthode, présentant des diamètres compris entre 26,50±0,50 mm et 34,00±1,00 mm, n’ont fait que confirmer les résultats de la première méthode, et révèlent aussi bien la forte inhibition de l’huile.

Cette inhibition a été observée pour toutes les souches testées à la seule exception de *Pseudomonas aeruginosa*, qui n'a présenté aucune zone d'inhibition et cela par les deux méthodes. La résistance de cette bactérie est due à la capacité qu'elle possède pour former un biofilm. Ce dernier est une organisation complexe, composée de différentes strates dans lesquelles les bactéries se trouvent dans des états physiologiques spécifiques à leur situation. Il est établi que le traitement de telles bactéries nécessite des concentrations considérables d'agents antimicrobiens **(47, 51, 52)**

Selon **Gulluce et al (53)** et **Kalemba et al (54)**, quelques huiles essentielles contenant des structures phénoliques comme le carvacrol et thymol sont hautement actives contre un large spectre de microorganismes. Ce qui explique les propriétés antibactériennes de l'huile essentielle de thym riche en carvacrol et thymol.

III-I-4-2 – Détermination des paramètres de l'activité antimicrobienne

Le choix des bactéries s'est porté sur toutes les souches mis à part *Pseudomonas aeruginosa*. La méthode utilisée concerne la détermination des CMI et CMB en milieu liquide décrite dans le chapitre, et dont les résultats obtenus sont résumés dans le Tableau III-10.

Les résultats de la lecture de la CMI permettent de constater que l'huile essentielle de thym est plus efficace sur l'inhibition de *Micrococcus luteus* (CMI = 0,026 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$)^a et de *Salmonella typhimurium* (CMI = 0,104 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$)^a, en comparaison avec *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* (CMI = 0,208 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$)^a.

Par ailleurs les résultats de la CBM montrent une efficacité similaire pour les souches *Listeria monocytogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* avec une CMB obtenue à une concentration de 0,416 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ (a). Cette efficacité est moindre pour *Salmonella typhimurium* (CMB = 0,833 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$)^a. Par contre sur les deux souches *Salmonella enteritidis* et *Enterococcus faecalis*, l'huile essentielle de thym n'a pas

eu d'effet bactéricide du moment qu'une croissance bactérienne a été observée pour toutes les dilutions.

Tableau III-10 : Résultats de la détermination de la CMI et de la CMB pour l'H.E de thym.

| Souche bactérienne | CMI | CMB | Rapport CMB/CMI |
|-------------------------------|----------------|---|--|
| <i>Escherichia coli</i> | Dilution 1/64 | Dilution 1/16 | 4 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Dilution 1/64 | Dilution 1/16 | 4 |
| <i>Micrococcus luteus</i> | Dilution 1/512 | Dilution 1/16 | 32 |
| <i>Salmonella typhimurium</i> | Dilution 1/128 | Dilution 1/8 | 16 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | Dilution 1/64 | Présence d'une croissance bactérienne pour toutes les dilutions | Le rapport ne peut être défini en absence de CMB |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | Dilution 1/64 | Dilution 1/16 | 4 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | Dilution 1/64 | Dilution 1/16 | 4 |
| <i>Salmonella enteritidis</i> | Dilution 1/64 | Présence d'une croissance bactérienne pour toutes les dilutions | Le rapport ne peut être défini en absence de CMB |

^a : les concentrations sont données en µL d'H.E. par mL de milieu de culture.

Le rapport CMB/CMI indique que l'huile essentielle de thym est bactériostatique envers *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* et *Klebsiella pneumoniae* ($2 < \text{CMB/CMI} < 32$). Par contre la souche *Micrococcus luteus* est tolérante à l'huile ($\text{CMB/CMI} \geq 32$).

III-I-5- Détermination de la cinétique de bactéricidie de *Listeria monocytogenes* en présence de l'huile essentielle de thym

Lors de cette étape de notre travail, nous avons réalisé une cinétique de bactéricidie pour permettre de mieux caractériser l'effet de l'huile essentielle sur la souche bactérienne testée.

Notre choix s'est porté sur *Listeria monocytogenes* à cause de son caractère fortement pathogène et sa grande sensibilité à l'huile essentielle de thym. Nous avons suivi l'évolution du nombre de bactéries viables en présence de deux concentrations d'huile essentielle de thym :

- La solution mère.
- La dilution qui a permis d'obtenir la CMB

Nous avons également suivi l'évolution du nombre de bactéries viables de la souche en présence d'éthanol. Cette courbe témoin est prise comme référence d'une croissance bactérienne normale.

Les dénombrements des bactéries viables effectués à des temps précis nous ont permis de tracer les graphes représentés dans la Figure III-9.

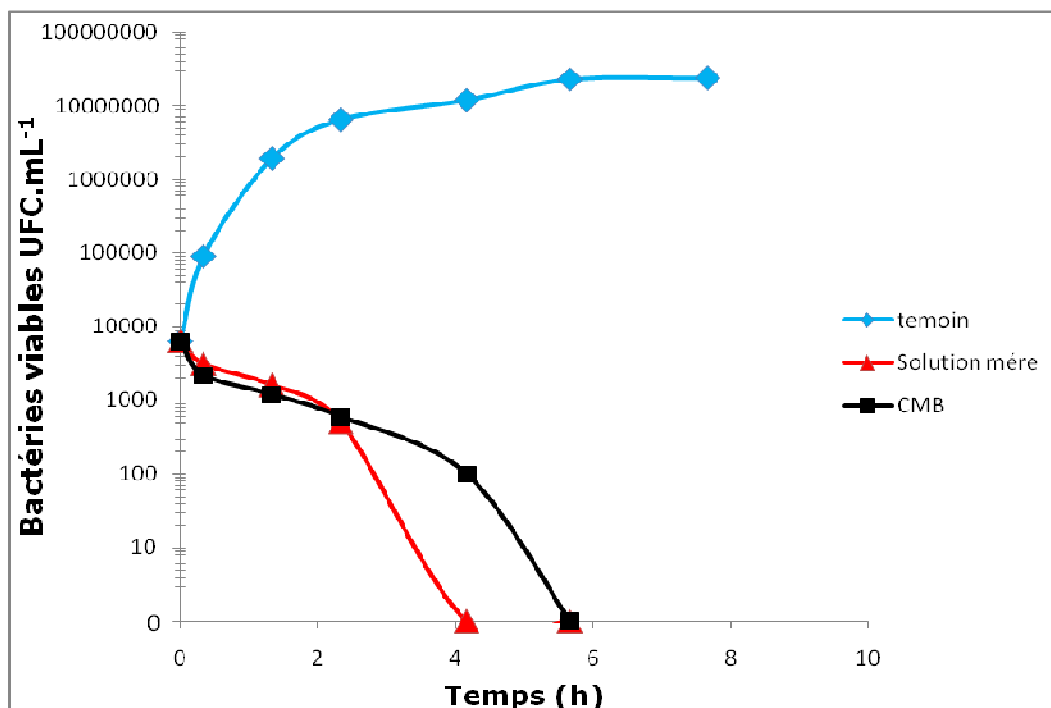


Figure III- 9 : Courbes de croissance bactérienne de *Listeria monocytogenes*

Dés les premières heures de culture, nous observons une diminution du nombre de bactéries initialement mis en contact avec les deux concentrations d'huile essentielle de thym. Cette diminution des bactéries viables continue progressivement pour atteindre une valeur nulle à $t = 4,66$ h soit 4h 39min, pour les bactéries mises en présence de la solution mère et à $t = 5,66$ h soit 5h 39min pour celles mises en présence d'une concentration de $0,416 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ (a).

En opposition avec le déclin des ces bactéries, celles mises en présence d'éthanol observent une croissance bactérienne avec une augmentation du nombre de bactéries.

Chapitre III-II - Etude de l'activité antifongique

III-II-1- Huile essentielle d'orange

L'étude de l'huile essentielle d'orange a été réalisée en effectuant l'aromatogramme par la méthode des puits.

Les mesures des diamètres des zones d'inhibition sont portées dans le tableau III-11

La Figure III-10 regroupe les photos des cultures fongiques en présence des puits remplis.

Tableau III-11 : Résultats du test de sensibilité à l'H.E d'orange

| Souche fongique | | Diamètre moyen d'inhibition (mm) |
|-----------------|---------------------------------|---|
| Levure | <i>Candida albicans</i> | 26,00±1,00 |
| | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 40,66±2,05 |
| Moisissur e | <i>Aspergillus niger</i> | Absence de zone d'inhibition (6,00±0,00) |
| | <i>Rhizopus stolonifer</i> | Absence de zone d'inhibition (6,00±0,00) |

Les résultats obtenus montrent que l'huile essentielle d'orange est inhibitrice envers les deux levures testées en formant une zone d'inhibition d'un diamètre de 26,00±1,00 mm pour *Candida albicans* et de 40,66±2,05 mm pour *Saccharomyces cerevisiae*. Par contre les deux moisissures ont eu une croissance normale sans formation d'aucune zone d'inhibition et ainsi semblent insensibles à l'huile.

III-II-2- Huile essentielle de lavande

L'étude de l'huile essentielle de lavande a été réalisée en effectuant l'aromatogramme par la méthode des puits.

Les mesures des diamètres des zones d'inhibition sont portées dans le tableau III-12.

Tableau III-12 : Résultats du test de sensibilité à l’H.E de lavande

| Souche fongique | | Diamètre moyen d’inhibition (mm) |
|-----------------|---------------------------------|----------------------------------|
| Levure | <i>Candida albicans</i> | 15,00±1,00 |
| | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 12,66±0,47 |
| Moisissure | <i>Aspergillus niger</i> | 15,66±0,94 |
| | <i>Rhizopus stolonifer</i> | 35,33±3,68 |

Les souches fongiques testées présentent toutes une sensibilité à l’huile essentielle de lavande. Cependant la moisissure *Rhizopus stolonifer* a été la plus inhibée par l’huile avec une zone d’inhibition d’un diamètre de 35,33±3,68 mm.

III-II-3- Huile essentielle de romarin

L’étude de l’huile essentielle de romarin a été réalisée en effectuant l’aromatogramme par la méthode des puits.

Les mesures des diamètres des zones d’inhibition sont portées dans le tableau III-13

Tableau III-13 : Résultats du test de sensibilité à l’H.E de romarin

| Souche fongique | | Diamètre moyen d’inhibition (mm) |
|-----------------|---------------------------------|----------------------------------|
| Levure | <i>Candida albicans</i> | 11,33±0,94 |
| | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 15,33±4,49 |
| Moisissu re | <i>Aspergillus niger</i> | 11,50±2,50 |
| | <i>Rhizopus stolonifer</i> | 34,00±8,98 |

Les résultats obtenus révèlent une légère inhibition de *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* et d'*Aspergillus niger* avec respectivement des zones d'inhibition de diamètre de $11,33 \pm 0,94$, $15,33 \pm 4,49$ et $11,50 \pm 2,50$ mm. Contrairement à *Rhizopus stolonifer* qui a été fortement inhibé par l'huile sur une zone de diamètre égal à $34,00 \pm 8,98$ mm.

III-II-4- Huile essentielle de thym :

L'étude de l'huile essentielle de thym a été réalisée en effectuant l'aromatogramme par la méthode des puits.

Les mesures des diamètres des zones d'inhibition sont portées dans le tableau III-14

Tableau III-14 : Résultats du test de sensibilité à l'H.E de thym

| Souche fongique | | Diamètre moyen d'inhibition (mm) |
|-----------------|---------------------------------|----------------------------------|
| Levure | <i>Candida albicans</i> | $34,00 \pm 1,00$ |
| | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | $29,66 \pm 1,24$ |
| Moisissure | <i>Aspergillus niger</i> | $35,50 \pm 1,50$ |
| | <i>Rhizopus stolonifer</i> | $37,00 \pm 2,00$ |

La mesure des zones d'inhibition révèle des diamètres compris entre $29,66 \pm 1,24$ et $37,00 \pm 2,00$ mm. Ce qui nous permet de dire que les souches fongiques testées ont toutes été fortement inhibées par la présence de l'huile essentielle de thym. Ce qui confirme les résultats trouvés par **Amarti et al (55)** lors de l'étude de l'activité de l'huile essentielle de thym sur *Aspergillus niger*.

III-II-5- Association d'huiles essentielles

Au cours de cette étape, nous avons voulu étudié l'activité antifongique d'un mélange d'huiles essentielles sur les deux moisissures *Aspergillus niger* et

Rhizopus stolonifer. Pour réaliser l'aromatogramme nous avons additionné l'huile essentielle d'orange et de romarin préalablement dissoutes dans l'éthanol.

Les mesures des diamètres des zones d'inhibition sont portées dans le tableau III-15

Tableau III-15 : Résultats du test de sensibilité « orange+romarin »

| Souche fongique | | Diamètre moyen d'inhibition (mm) |
|-------------------|----------------------------|----------------------------------|
| Moisissure | <i>Aspergillus niger</i> | 17,00±1,00 |
| | <i>Rhizopus stolonifer</i> | 20,66±2,05 |

Après la mesure des zones d'inhibition, nous constatons que le mélange des deux huiles essentielles présente de meilleurs résultats sur *Aspergillus niger* en donnant une zone de diamètre supérieure aux deux zones obtenues avec les deux huiles testées séparément. Ce qui nous permet de supposer l'existence d'un phénomène de synergie

En revanche la zone d'inhibition obtenue sur *Rhizopus stolonifer*, est inférieure à celle obtenue avec l'huile essentielle de romarin seul. Ainsi ces deux huiles semblent plutôt avoir un effet antagoniste pour inhiber *Rhizopus stolonifer*, qui peut être expliqué par la présence d'un composé de l'huile essentielle d'orange qui bloque l'activité du composé de l'huile essentielle de romarin responsable de l'inhibition de la moisissure.

Discussion générale

L'évaluation de l'activité antibactérienne et antifongique des quatre huiles essentielles sur lesquelles notre étude a porté, nous a permis de tracer les histogrammes représentés par les Figures III-15 et III-16 qui reprennent respectivement les résultats obtenus lors de la réalisation de l'aromatogramme par la méthode des puits sur les souches bactériennes et fongiques.

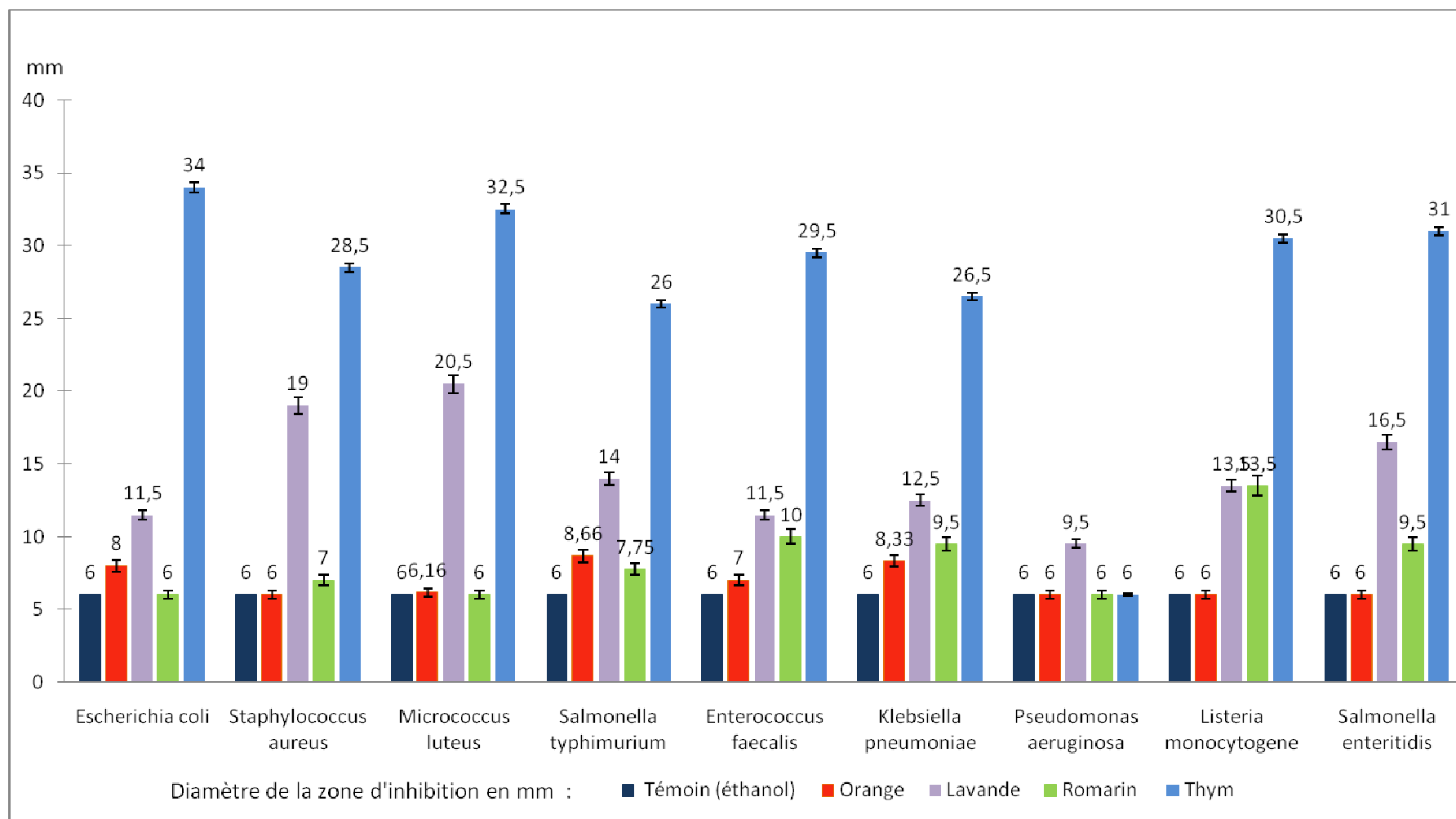


Figure III-15 : Histogramme des diamètres des zones d'inhibition des souches bactériennes en fonction des huiles essentielles étudiées (méthode des puits)

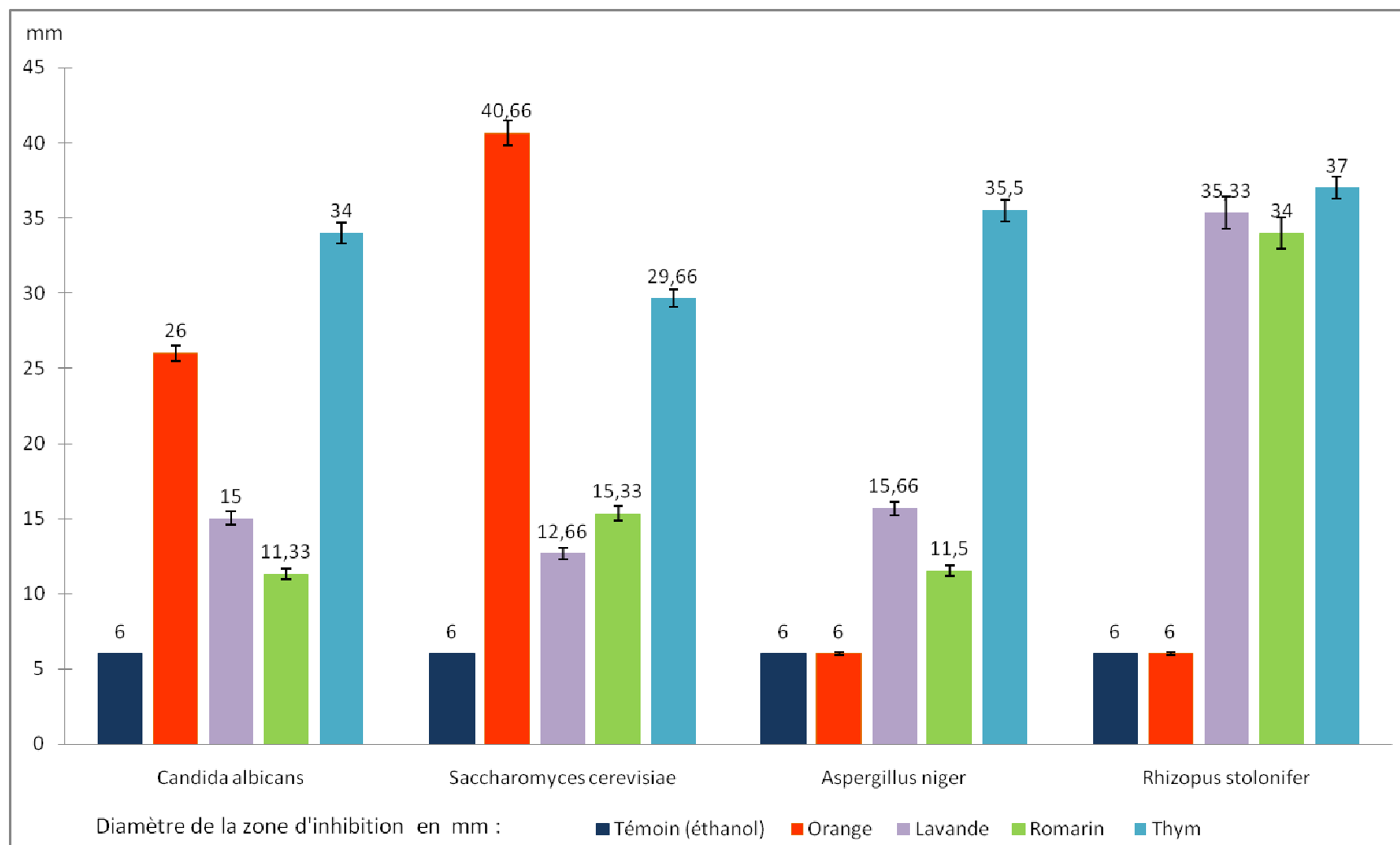


Figure III-16 : Histogramme des diamètres des zones d'inhibition des souches fongiques en fonction des huiles essentielles étudiées (méthode des puits)

La représentation des diamètres des zones d'inhibitions des souches bactériennes et fongiques testées sous forme d'histogramme nous a permis d'établir une comparaison de l'efficacité antimicrobienne des huiles essentielles étudiées.

Au terme de cette comparaison, il apparaît de manière évidente que l'huile essentielle de thym se caractérise par une activité antibactérienne prononcée et largement supérieure à celles des autres huiles.

Par ailleurs, l'huile essentielle de lavande montre également une activité antibactérienne mais de moindre importance que celle du thym et qui peut être qualifiée d'activité moyenne.

Par contre, les deux huiles essentielles d'orange et de romarin n'ont montré aucune efficacité envers les bactéries testées et ainsi se caractérisent par une absence d'activité antibactérienne.

D'un autre côté, cette même huile essentielle de thym a présenté les meilleurs résultats d'inhibition des champignons par la formation de zones importantes et cela pour les quatre souches testées.

Les huiles essentielles de lavande et de romarin quant à elles montrent une activité antifongique marquée sur *Rhizopus stolonifer* mais moyenne sur les trois autres souches.

Pour ce qui est de l'huile essentielle d'orange, elle a présenté la plus grande zone d'inhibition, en inhibant *Saccharomyces cerevisiae* sur un diamètre de plus de 40 mm mais a été totalement inefficace sur les deux souches de moisissures testées et de ce fait se caractérise par une activité contre les levures uniquement.

CONCLUSION GENERALE

Conclusion générale

La phyto-aromathérapie est la plus vieille thérapeutique du monde. L'homme s'est toujours servi des plantes, il leur a d'abord attribué des pouvoirs magiques, puis a appris peu à peu à discerner leurs propriétés.

Au court de ces dernières années, le plus grand intérêt est porté aux composés isolés des plantes pour éradiquer les microorganismes pathogènes devenus de plus en plus résistants aux antibiotiques et par conséquent combattre les maladies qui nuisent à la santé humaine.

Ces composés biotiques représentent une alternative intéressante aux agents antimicrobiens chimiques perturbateurs des systèmes métaboliques naturels vitaux et sources de pollution grandissante.

Ce travail a été mené dans le but de l'évaluation et de la caractérisation des propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles d'orange, de lavande, de thym et de romarin.

Nous avons trouvé que l'huile essentielle de thym et de lavande se caractérisent respectivement par une activité antimicrobienne importante et moyenne. Alors que celle du romarin et de l'orange ne possède pas d'activité antibactérienne mais seulement une sensibilité contre les levures testées pour l'orange et les quatre souches fongiques pour le romarin.

Par la suite, nous avons essayé de caractériser l'activité antibactérienne des deux huiles les plus inhibitrices par la détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI, et bactéricide CMB. Ces résultats ont également démontré l'efficacité de l'huile essentielle de thym qui a présenté une inhibition et une bactéricidie à des concentrations plus basses que celle obtenues pour l'huile essentielle de lavande.

La cinétique de bactéricidie relative à la croissance de la souche *Listeria monocytogenes* en présence de l'huile essentielle de thym a révélé que la lyse totale des bactéries est obtenue après 4h 39min de contact lorsque ces dernières sont mises en présence de la solution mère (plus forte concentration en huile essentielle) et après un temps de 5h 39min pour la dilution 1/16.

Dans la perspective de poursuivre et d'enrichir ce travail, il peut être approfondi en :

- Déterminant les concentrations minimales inhibitrices CMI et fongicides CMF des souches fongiques testées.
- Réalisant un fractionnement des huiles essentielles pour isoler leurs différents constituants afin de déterminer les composés responsables de l'activité antimicrobienne.

Références Bibliographiques

- (1) Académie Nationale De Pharmacie. Rapport : Médicaments et environnement (Juin 2008).
- (2) Y. Levi. Inquiétudes sur la présence d'antibiotiques et de bactéries antibiorésistantes dans les eaux. *Environ Risques Santé* (2006) 5, 261-265.
- (3) M. Friedman, P.R. Henika, R. E. Mandrell. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection* (2002) 65,1545-1560.
- (4) Collectif Sélection du Reader's Digest. Phytothérapie, la santé par les plantes. Sélection du Reader's Digest, Vidal (2007) P 8, 140, 215, 198.
- (5) J.P. Durvelle. Fabrication des essences et des parfums – chimie des parfums. Edition Desforges, Girardot et Cie Paris (1930) P 807.
- (6) AFNOR (Association Française de Normalisation) Huiles essentielles. Recueil des normes françaises, 5^{ème} édition, AFNOR Paris (1996) T2, p 4.
- (7) G. Richter. Métabolismes des végétaux : Physiologie et biochimie. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes (1993) P 292.
- (8) J. Garnero. Problèmes rencontrés au cours de l'étude de la composition chimique des huiles essentielles. In *Parfums cosmétiques, aromes* (1977) 14, 31-40.
- (9) G. De Billerbeck. Activité fongique de l'huile essentielle de cymbopogon nardus sur l'*Aspergillus niger*. Evaluation d'un bioréacteur pour l'étude de l'effet inhibiteur des substances volatiles en phase vapeur." *Faculté des*

sciences pharmaceutiques, Institut national polytechnique de Toulouse, (2000).

- (10) M.C. Pibiri, C. Seigniez et *al* . Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles et leurs effets sur le bien-être des occupants. *CISBAT* Lausanne (2001).
- (11) Risso, A. Poiteau. *Histoire et culture des orangers*. Edition Henri Plon Paris (1872).
- (12) Oranger, capture à partir de :
<http://fr.wikipedia.org/wiki/oranger>
- (13) "oranger" Encyclopédie Microsoft® Encarta® en ligne 2009
<http://fr.encarta.msn.com> © 1997-2009 Microsoft Corporation. Tous droits réservés.
- (14) D. Baudoux. *L'aromathérapie - Se soigner par les huiles essentielles*. Edition Amyris (1998).
- (15) R. Anton. *Plantes thérapeutiques, tradition, pratique officinale, science et thérapeutique*. Edition Tec & Doc - Editions médicales internationales (2003). P 133, 475-478, 523-525.
- (16) F. E. Köhler. *Köhlers Medizinal-Pflanzen in naturgetreuen Abbildungen und kurz erläuterndem Texte*, Gera (1883-1914).
- (17) Lavande, capture à partir de :
<http://fr.wikipedia.org/wiki/Lavande>
- (18) Thym, capture à partir de :
http://fr.wikipedia.org/wiki/Thymus_vulgaris
- (19) Romarin, capture à partir de :
<http://fr.wikipedia.org/wiki/Romarin>

- (20) J-L. Fauchère, J-L. Avril. Bactériologie générale et médicale. Ellipses Marketing (2002). P
- (21) Agent infectieux, capture à partir de :
<http://fr.wikipedia.org/wiki/Pathog%C3%A8ne> . 2009
- (22) E. Erbe, C. Pooley. Low-temperature electron micrograph of a cluster of E. coli bacteria, magnified 10,000 times. United States Department of Agriculture.
- (23) Photo *Escherichia coli*, capture à partir de :
<http://www.eyeofscience.de/eos2/english/gallery/templates/galeriepics/bakterviren/escherisch.jpg>
- (24) M. Bugnicourt. Dictionnaire de microbiologie générale. Ellipses édition marketing SA (1995).
- (25) *Staphylococcus aureus*. Copyright © Dennis Kunkel Microscopy, Inc (2009).
- (26) *Micrococcus luteus*. Copyright © Dennis Kunkel Microscopy, Inc (2006).
- (27) S. Yang, S. Sugawara, T. Monodane, M. Nishijima, Y. Adachi, S. Akashi, K. Miyake, S. Hase, and H. Takada. *Micrococcus luteus* Teichuronic Acids Activate Human and Murine Monocytic Cells in a CD14- and Toll-Like Receptor 4-Dependent Manner. *Infection and Immunity* (April 2001) Vol. 69, No. 4, p. 2025-2030
- (28) K. J. Smith, R. Neafie, J. Yeager, and H. G. Skelton. *Micrococcus folliculitis* in HIV-1 disease. *British Association of Dermatologists. British Journal of Dermatology* (1999) vol. 141, no. 3. (558-561)
- (29) *Listeria monocytogenes*. Copyright © Dennis Kunkel Microscopy, Inc. (2004).

- (30) N. Shankar, S. Ausmus. *Enterococcus faecalis*. University of Oklahoma.
- (31) Schleifer, Kilpper-Bälz. *Enterococcus faecalis* (1984).
- (32) Confocal microscope image of *Klebsiella pneumoniae*. Book of micorobiology. Institute of Microbiology, Seoul National University (2005).
- (33) F. N. Bruun, G. J. McGarrity, W.S. Blakemore, L. L. Coriell. Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* infections: determination by pyocin typing. *Journal of Clinical Microbiology* (1976 March) : 3(3): 264-271.
- (34) *Salmonella typhimurium*. Rocky Mountain Laboratories. National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID). National Institutes of Health (NIH).
- (35) *Candida albicans*. Copyright © Dennis Kunkel Microscopy, Inc (2004).
- (36) A. Domart , J.Bourneuf. Nouveau Larousse Médical. Edition Larousse France (1985).
- (37) E. Gharakhanian. Investigating Lysosomal Trafficking. Cell Biology Laboratory, Departments of Biological Sciences, California State University Long Beach.
- (38) *Aspergillus niger*. Copyright © The Regents of the University of California (1997-2009).
- (39) *Rhizopus stolonifer*. Dipartimento di Botanica.Università di Catania. Italia.
- (40) P. Belaiche, 1979. "L'aromatogramme". *Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. M. S. A. Editeur, Paris. Tome 1, (2004).*
- (41) J-N. Joffin, G. Leyral. *Microbiologie technique tome I, dictionnaire des techniques. Centre régionale de documentation pédagogique d'Aquitaine (2006). P 32*

- (42) P. Courvalin, R. Leclercq, E. Bingen. Antibiogramme. EDITION ESKA. (2006)
- (43) Antifongique, capture à partir de :
<http://www.vulgaris-medical.com/encyclopedie/antifongique-8607.html>
- (44) S. Bertouche . Optimisation de procédés d'extraction d'huile essentielle de thym. Thèse de Magister en Génie des procédés, USTHB (2009) p 130.
- (45) V.-G. de Billerbeck. Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. *Phytothérapie* (2007) 5 : 250, 249-253.
- (46) M.R. Meena et Sethi V. Antimicrobial activity of the essential oils from spices. *Journal of Food Science and Technology Mysore*, (1994): 31, 68 – 70.
- (47) (47)M.C Pibiri. Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huile essentielle. Thèse Doctorat, Lausanne, Canada (2006) 177.
- (48) (48)J. Kaloustian. J. Chevalier. C. Mikail. M. Martino. L. Abou. M.-F. Vergnes. Etude de six huiles essentielles : composition chimique et activité antibactérienne. *Phytothérapie* (2008) 6: 160–164.
- (49) S. Djeddi. N. Bouchenah. I. Settar. H. D. Skaltsa. Composition and Antimicrobial Activity Of The Essential Oil Of *Rosmarinus officinalis* FROM ALGERIA. *Chemistry of Natural Compounds* (2007), Vol. 43, No. 4, 487-490.
- (50) Valero M., Salmeron M.C. Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth International. *Journal of Food Microbiology*, (2003) 85, 73–81.
- (51) J. Fleurette, J. Freney, M.E. Reverdy. Antiseptie et désinfection. ESKA, (1995) 199-221.

- (52) V. De Feo, M. Bruno, B. Tahiri, F. Napolitano, F. Senatore. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils from *Thymus spinulosus* Ten. (Lamiaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2003): 51, 3849-3853.
- (53) M. Gulluce, M. Sokmen, D. Daferera, G. Agar, H. Ozkan, N. Kartal, M. Polissiou, A. Sokmen, Sahin. Essential Oils Of *Lamiaceae* Plants Of Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (2003). 51:3958.
- (54) D. Kalembe, A. Kunicka. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, (2003) 10:813.
- (55) F. Amarti, B. Satrani, A. Aafi, M. Ghanmi, A. Farah, M. Aberchane, M. El Ajjouri, S. El Antry, A. Chaouch. Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus capitatus* et de *Thymus bleicherianus* du Maroc. *Phytothérapie* (2008) 6: 342–347.

Annexes

Annexe N°1: Composition du bouillon nutritif

Pour la préparation d'un litre de bouillon nutritif, on introduit dans une fiole :

- Peptone : 10 g.
- Extrait de levure : 5 g.
- NaCl : 5 g.

On complète à 1 litre avec de l'eau distillée, on répartie la solution obtenues dans des tube à hémolyse et on stérilise à l'autoclave.

Annexe N°2: Composition de la gélose Plat Count Agar « PCA »

Pour la préparation d'un litre de gélose PCA, on introduit dans une fiole :

- peptone: 5,0 g
- extrait de levure: 2,5 g
- glucose: 1,0 g
- agar: 15,0 g

On complète à 1 litre avec de l'eau distillée, la solution est ensuite menée à ébullition en maintenant une agitation constate.

On répartie la solution obtenues dans des flacons à gélose et on stérilise à l'autoclave.

Annexe N°3: Composition de la gélose Yeast Malt Ager « YMA »

Pour la préparation d'un litre de gélose YMA, on introduit dans une fiole :

- extrait de malt : 3 g.
- extrait de levure: 3 g
- peptone de viande : 5 g
- glucose: 10 g
- agar: 20 g

On complète à 1 litre avec de l'eau distillée, la solution est ensuite menée à ébullition en maintenant une agitation constate.

On répartie la solution obtenues dans des flacons à gélose et on stérilise à l'autoclave.

Annexe N°4: Composition de la gélose OGA

Pour la préparation d'un litre de gélose OGA, on introduit dans une fiole :

- extrait de levure: 5 g
- glucose: 10 g
- agar: 10 g

On complète à 1 litre avec de l'eau distillée, la solution est ensuite menée à ébullition en maintenant une agitation constante.

On répartie la solution obtenues dans des flacons à gélose et on stérilise à l'autoclave.

Annexe N°5: Matériel utilisé

- Autoclave de marque CERTOCLAV.
- Etuve de marque MEMMERT.
- Spectrophotomètre UV/visible de marque SHIMADZU.
- Agitateur vortex de marque FISHER bioblock scientific.
- Plaque chauffante munie d'un agitateur de marque STUART.
- Bec bunsen.
- Boîtes de Pétri.
- Tubes à hémolyse.
- Micro-seringue.
- Verrerie courante de laboratoire.

Annexe N°6 : Calcul du diamètre moyen d'inhibition.

Le diamètre moyen et l'écart type sont calculés à l'aide des relations suivantes :

$$D_{\text{moy}} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n D_i \quad ; \quad \text{ecart type} = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n [(D)_i - D_{\text{moy}}]^2}$$

ملخص

خصص هذا العمل لتحديد النشاط المضاد للبكتريا و الفطريات لأربعة زيوت أساسية من اجل وضع دراسة مقارنة لنشاطها الحيوي
اختبرت كل من الزيوت الأساسية للبرتقال، الخزامى، الزعتر و الإكليل على 13 سلالة من الجراثيم و من بينها المسببة للأمراض.
ثبتت هذه الدراسة أن الزيت المستخلصة من الزعتر هي الأكثر نشاط حيث تمكنت من قتل أو إيقاف نشاط الجراثيم بتركيزات منخفضة.

مفاتيح : الزيوت الأساسية، مضاد الجراثيم، البرتقال، الخزامى، الزعتر، الإكليل

Résumé

Ce travail a été consacré à la détermination de l'activité antibactérienne et antifongique de quatre huiles essentielles dans le but d'établir une étude comparative de leur bioactivité.

Les huiles essentielles d'orange, de lavande, de thym et de romarin ont été testées sur 13 souches microbiennes pathogènes ou non. L'évaluation de l'activité antimicrobienne a permis la sélection des souches les plus sensibles pour la détermination de la CMI et CMB.

L'huile essentielle de thym s'est révélée être la plus active en présentant des effets bactéricides et bactériostases à des concentrations très basses.

Mots clés : huiles essentielles, activité antimicrobienne, orange, lavande, thym, romarin.

Abstract

This work has been devoted to the determination of antibacterial and antifungal activity of four essential oils in order to establish a comparative study of their bioactivity.

The essential oils of orange, lavender, thyme and rosemary were tested on 13 strains microbial pathogens or pests. The evaluation of the antimicrobial activity had allowed the selection of the most sensitive strains for the determination of the MIC and MBC.

The essential oil of thyme was the most active with presenting bacteriostasis and bactericidal effects at very low concentrations.

Keywords: essential oils, antimicrobial activity, orange, lavender, thyme, rosemary.