REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

**UNIVERSITE DE JIJEL**
**FACULTE DES SCIENCES**
**DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE MICROBIOLOGIE**

# MEMOIRE

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE MAGISTER EN BIOLOGIE

OPTION : ***PHYTOPHARMACOLOGIE***

## THEME

# *EFFET DES EXTRAITS DE CERTAINES PLANTES AROMATIQUES SUR LES GERMES PATHOGENES ISOLES A PARTIR DE PRODUITS PATHOLOGIQUES DES ANIMAUX DOMESTIQUES*

**BOUSSOUF LYLIA**

Soutenue le : 04/11/2006.

MEMBRES DU JURY

| | | | |
|---|---|---|---|
| PRESIDENT | : Dr LAHOUEL | Mesbah | MC (Université de Jijel) |
| RAPPORTEUR | : Dr LEGHOUCHI | Essaid | MC (Université de Jijel) |
| EXAMINATEUR | : Dr KHELILI | Smail | MC (Université de Jijel) |
| EXAMINATEUR | : Pr BOUSSEBOUA | Haçène | Pr (Université de Constantine) |

جامعة جيجل
المكتبة المركزية
TH 074
615/26

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

**UNIVERSITE DE JIJEL**
**FACULTE DES SCIENCES**
**DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE MICROBIOLOGIE**

# MEMOIRE

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE MAGISTER EN BIOLOGIE

OPTION : ***PHYTOPHARMACOLOGIE***

## THEME

# *EFFET DES EXTRAITS DE CERTAINES PLANTES AROMATIQUES SUR LES GERMES PATHOGENES ISOLES A PARTIR DE PRODUITS PATHOLOGIQUES DES ANIMAUX DOMESTIQUES*

**BOUSSOUF LYLIA**

Soutenue le : 04/11/2006.

MEMBRES DU JURY

| | | | |
|---|---|---|---|
| PRESIDENT | : Dr LAHOUEL | Mesbah | MC (Université de Jijel) |
| RAPPORTEUR | : Dr LEGHOUCHI | Essaid | MC (Université de Jijel) |
| EXAMINATEUR | : Dr KHELILI | Smail | MC (Université de Jijel) |
| EXAMINATEUR | : Pr BOUSSEBOUA | Haçène | Pr (Université de Constantine) |

# Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier dieu, le tout-puissant, qui m'a aidé à réaliser ce travail.

Je remercie très sincèrement le Dr. Leghouchi Essaid, maitre de conférence à l'Université de Jijel et directeur de laboratoire de pharmacologie et de phytochimie, d'avoir accepté la charge d'être rapporteur de ce mémoire, je suis très reconnaissante en vers lui pour sa constante disponibilité, mais aussi pour sa bonne humeur et sa modestie.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Mr. Boudjerda Djamel, maître assistant à l'Université de Jijel, pour son aide, ses conseils importants et pour avoir suivi de très prés l'évolution de ce travail.

Mes remerciements vont également à Dr. Lahouel Mesbah, maitre de conférence à l'Université de Jijel, Dr. Khelili Smail, maitre de conférence à l'Université de Jijel et le Pr. Bousseboua Hacène de l'Université de Constantine, d'avoir accepté de faire partie des membres de mon jury. Je suis très honorée de leur présence, qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

Je remercie affectueusement mon très cher père, pour toute son aide aussi bien matérielle que morale dont il m'a fait preuve.

Un immense merci à mes très très chères amies et collègues de laboratoire : nana, smisma, mouni, nassoum, wassila, affaf, sousou et dodo aussi bien pour leur amitié que pour leur fidélité. Mes remerciements s'adressent aussi à Tarek mon collègue de laboratoire.

Je tiens aussi à exprimer ma gratitude à Massika et aux ingénieurs de laboratoire : Yahia, Soumia, Sonia et Assia, pour leur précieuse aide, et surtout leur gentillesse.

Je souhaite également remercier M$^{me}$ Kahlet Massika, pour son aide, son soutien moral et ses encouragements.

Un merci spécial à Mr Djafri Abde Nasser et Boussouf Nabil, de m'avoir fournir une grande partie du matériel que j'avais besoin.

Merci à ma sœur Nafissa, pour sa précieuse aide.

En fin je remercie profondément toute ma famille, mes chères amies pour leur patience et leur affection continuelle.

# *Liste des abréviations*

| | |
|---|---|
| **ADH** | Argénine déshydrolase |
| **CMB** | Concentration minimale bactéricide |
| **CMI** | Concentration minimale inhibitrice |
| **CPG** | Chromatographie en phase gazeuse |
| **DMAPP** | Diphosphate de diméthylallyle |
| **DO** | Densité optique |
| **DPPH** | 1,1-diphényl-2-pycril-hydrazyl |
| **DXP** | 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate |
| **E.coli** | Escherichia coli |
| **FPP** | Diphosphate de farnésyle |
| **GGPP** | Diphosphate de géranylgéranyle |
| **GPP** | Diphosphate de géranyle |
| **$H_2O_2$** | Eau oxygénée |
| **HMBPP** | (E)-4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényle |
| **HMG CoA** | Hydroxyméthylglutaryl-CoA |
| **IPP** | Diphosphate d'isopentényle |
| **LDC** | Lysine décarboxylase |
| **LPS** | Lipopolysaccharide |
| **MECDP** | 2-*C*-méthyl-D-érythritol 2,4-cyclodiphosphate |
| **MEP** | 2-*C*-méthyl-D-érythritol 4-phosphate |
| **MVA** | Mévalonate |
| **$NO_2^-$** | Nitrite |
| **$NO_3^-$** | Nitrate |
| **ODC** | Ornithine décarboxylase |
| **RM** | Rouge de méthyle |
| **SFB** | Bouillon au selinite acide de sodium et cystine |
| **SM** | Spectrométrie de masse |
| **VP** | Vosges-Proskaur |

# *Sommaire*

**Introduction** ..... 1

**Etude Bibliographique**

**Les huiles essentielles** ..... 4

I. **Définition** ..... 4
II. **Historique** ..... 4
III. **Répartition** ..... 5
IV. **Localisation** ..... 6
V. **Composition chimique** ..... 6
1. Les composés terpéniques ..... 6
2. Les dérivés du phénylpropane ..... 9
VI. **La Biosynthèse** ..... 10
1. Les terpénoides ..... 10
1.1 La voie du mévalonate (MVA) ..... 11
1.2 La voie de 2-C-méthyl-D-érythritol 4 phosphate (MEP) ..... 12
2. Les dérivés du phénylpropane ..... 14
VII. **Applications thérapeutiques et écologiques** ..... 14
VIII. **Activité Antimicrobienne** ..... 14
1. Biocidie et Biostase ..... 14
2. Souches microbiennes ..... 15
3. Rôle de la méthode dans la détermination de la l'activité ..... 15
4. Association d'huiles essentielles ..... 16
5. Activité liée à la composition chimique ..... 16
IX. **Activité Antioxydante** ..... 17
X. **Caractérisation des huiles essentielles** ..... 17
1. La chromatographie en phase gazeuse (CPG) ..... 18
2. Le couplage CPG / spectrométrie de masse(SM) ..... 18

**Etude Expérimentale**

**I. Matériel et méthodes** ..... 22

1. **Matériel végétal** ..... 22
1.1. Sélection des plantes ..... 22
1.1.1. Origanum vulgare ..... 22
a. Description botanique et principaux constituants ..... 22
b. Utilisation thérapeutique ..... 23
1.1.2. Mentha pulegium ..... 23
a. Description botanique et principaux constituants ..... 24
b. Utilisation thérapeutique ..... 24
1.1.3. Lavandula stoechas ..... 24
a. Description botanique et principaux constituants ..... 25
b. Utilisation thérapeutique ..... 25

1.1.4. Achillea odorata ..... 25
a. Description botanique et principaux constituants ..... 26
b. Utilisation thérapeutique ..... 26

1.2. Récolte des plantes ..... 26
1.3. Hydrodistillation des huiles essentielles ..... 27
1.4. Analyse chimique des huiles essentielles ..... 28

**2. Souches microbiennes** ..... 29

2.1 Souches bactériennes ..... 29
2.1.1. Origine ..... 29
a. Le genre Salmonella ..... 29
b. Espèce Escherichia coli ..... 29
c. Espèce Staphylococcus aureus ..... 30
d. Le genre Streptococcus ..... 30
2.1.2. Conservation ..... 30
2.1.3. Entretien ..... 31
2.1.4. Reidentification des souches ..... 31
2.1.4.1. Revivification des souches ..... 31
2.1.4.2. Isolement des colonies ..... 31
2.1.4.3. Identification morphologique des souches ..... 31
2.1.4.4. Profil biochimique ..... 32
a. Profil biochimique pour les Salmonelles et E.coli ..... 32
b. Profil biochimique pour les Staphylocoques aureus ..... 36
c. Profil biochimique pour les Sterptocoques ..... 36

2.2. Souche fongique ..... 37
2.2.1. Prélèvement ..... 37
2.2.2. La culture ..... 37
2.2.3. Identification ..... 37

**3. Etude de l'activité antimicrobienne des quatre huiles essentielles** ..... 38

3.1. Méthode de diffusion en puits ..... 38
3.1.1. Tests antibactériens ..... 38
a. Préparation des inoculums ..... 38
b. Procédure ..... 38
c. Quantité minimale inhibitrice ..... 39
3.1.2. Tests antifongiques ..... 39

3.2. Méthode des microatmosphères ..... 40
3.2.1. Tests antibactériens ..... 41
a – Préparation des disques ..... 41
b – Préparation des inoculums ..... 41
c – Procédure ..... 41

**4. Evaluation de l'effet scavenger ( méthode au DPPH°)** ..... 41

**II. Résultats** ..... 44

**1. Hydrodistillation** ..... 44

**2. Analyse chimique** ..... 44

2.1. Profil chromatographique de l'huile essentielle d'Achillea odorata ..... 44
2.2. Profil chromatographique de l'huile essentielle d'Origanum vulgare ..... 45
2.3. Profil chromatographique de l'huile essentielle de Lavandula stoechas ..... 45
2.4. Profil chromatographique de l'huile essentielle de Mentha pulegium ..... 45

**3. Résultats de l'identification des souches bactériennes** ..... 47

3.1. Isolement des souches ..... 47
3.2. Coloration de Gram ..... 48
3.3. Profil biochimique ..... 50
a. Profil biochimique pour les salmonelles et les E.coli ..... 50
b. Profil biochimique pour les Staphylococcus aureus et les Streptococcus ..... 50

**4. Résultats de l'identification du dermatophyte** ..... 52

**5. Résultats de l'activité antimicrobienne des quatre huiles essentielles** ..... 52

5.1. Méthode de diffusion en puits ..... 52
5.1.1. Résultats des tests antibactériens ..... 52
a. Action de l'huile essentielle d'Origanum vulgare ..... 53
b. Action de l'huile essentielle d'Achillea odorata ..... 54
c. Action de l'huile essentielle de Mentha pulegium et Lavandula stoechas ..... 55
d. Quantité minimale inhibitrice pour l'huile essentielle d'Origanum vulgare ..... 58
5.1.2. Résultats des tests antifongiques ..... 59
5.2. Méthode des microatmosphères ..... 59

**6. Résultats de l'évaluation de l'effet scavenger des quatre huiles essentielles** ..... 61

**III. Discussion** ..... 63

**Conclusion** ..... 69

**Références bibliographiques** ..... 71

**Annexes** ..... 86

# *Liste des figures*

**Figure1** : Unité isoprénique..... 6
**Figure2:** Exemples de composants monoterpéniques..... 7
**Figure3:** Exemples de composants sesquiterpéniques..... 7
**Figure4 :** Exemple de composants diterpéniques..... 8
**Figure5:** Exemple de composants triterpérniques..... 8
**Figure6 :** Caoutchouc naturel..... 9
**Figure7 :** Phénylpropanes et composées de dégradation d'acides gras et de terpènes..... 9
**Figure8 :** Biosynthèse du diphosphate d'isopentényle selon la voie du mévalonate..... 11
**Figure 9** : Biosynthèse du diphosphate d'isopentényle et de diméthylallyle selon la voie du 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate..... 12
**Figure 10 :** Biosynthèse des isoprénoides à partir du diphosphate d'isopentényle (IPP)..... 13
**Figure 11:** Plante d'*Origanum vulgare*..... 22
**Figure 12:** *Mentha pulegium*..... 23
**Figure 13:** *Lavandula stoechas* ..... 24
**Figure 14 :** Plante d' *Achillea odorata*..... 25
**Figure 15** : Appareil d'hydrodistillation..... 27
**Figure 16 :** Méthode des microatmosphères..... 40
**Figure 17 :** Forme radicalaire et réduite du DPPH°..... 42
**Figure 18 :** Structure chimique de la quercitine..... 42
**Figure 19:** Chromatogramme des composants de l'huile essentielle d'*Achillea odorata*..... 46
**Figure 20 :** Chromatogramme des composants de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare*..... 46
**Figure 21 :** Chromatogramme des composants de l'huile essentielle de *Lavandula stoechas*..... 46
**Figure 22 :** Chromatogramme des composants de l'huile essentielle de *Mentha pulegium*..... 47
**Figure 23 :** Souches *E.coli*..... 48
**Figure 24 :** Souches *Salmonella*..... 48
**Figure 25** : Souches *Staphylococcus aureus*..... 48
**Figure 26 :** Souches *Streptococcus*..... 48
**Figure 27 :** La coloration de Gram des souches..... 49
**Figure 28 :** La culture du dermatophyte..... 52
**Figure 29 :** Comparaison entre les moyennes des zones d'inhibition entre les bactéries Gram positif et Gram négatif pour les quatre huiles essentielles..... 57
**Figure 30 :** Effets des quatre huiles essentielles sur le développement du *Microsporum spp*..... 59
**Figure31:** Zones d'inhibition formées selon la méthode des microatmosphères..... 60
**Figure 32 :** Effets scavenger de l'extrait éthanolique de la quercitine et des extraits purs des huiles essentielles vis à vis du radical DPPH° *in vitro*..... 62
**Figure 33 :** Structure schématique de la paroi des bactéries à Gram négatif..... 66
**Figure 34 :** Structure schématique de la paroi des bactéries à Gram positif..... 66

# *Liste des tableaux*

**Tableau 1 :** Exemples de familles et d'espèces riches en huiles essentielles..... 5

**Tableau 2 :** Structure générale des principaux agents antimicrobiens..... 17

**Tableau 3 :** Espèces utilisées dans l'expérimentation..... 27

**Tableau 4 :** Conditions opératoires d'hydrodistillation selon les plantes sélectionnées..... 28

**Tableau 5 :** Durée d'extraction, rendement et couleur des huiles essentielles obtenues..... 44

**Tableau 6 :** Quelques composants des quatre huiles essentielles déterminés par CPG/ SM..... 45

**Tableau 7 :** Identification biochimique des souches testées..... 51

**Tableau 8 :** Transcription des valeurs des diamètres d'inhibition pour 10 µl d'huiles essentielles..... 53

**Tableau 9 :** Diamètres des zones d'inhibition de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* vis à vis des souches Gram négatif..... 53

**Tableau 10 :** Diamètres des zones d'inhibition de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* vis à vis des souches Gram positif..... 54

**Tableau 11 :** Diamètres des zones d'inhibition pour l'huile essentielle d'*Achillea odorata* vis à vis des souches Gram négatif..... 54

**Tableau 12:** Diamètres des zones d'inhibition pour l'huile essentielle d'*Achillea odorata* vis à vis des souches Gram positif..... 55

**Tableau 13 :** Diamètres des zones d'inhibition des huiles essentielles de *Mentha pulegium* et *Lavandula stoechas* vis à vis des souches Gram négatif..... 56

**Tableau 14 :** Diamètres des zones d'inhibition des huiles essentielles de *Mentha pulegium* et *Lavandula stoechas* vis à vis des souches Gram positif..... 56

**Tableau 15 :** Quantité minimale inhibitrice pour l'huile essentielle d'*Origanum vulgare*..... 58

**Tableau 16 :** Diamètres des zones d'inhibition de l'huile essentielle *Origanum vulgare* vis à vis des cinq souches testées selon les deux méthodes..... 61

**Tableau 17 :** Pourcentage de réduction pour les quatre huiles essentielles..... 61

# Introduction

# Introduction :

L'Algérie, à l'instar des pays Magrébins, accorde une grande importance à l'élevage des animaux, qui offrent d'énormes avantages sur le plan zootechnique, économique et socioculturel. Malheureusement, l'utilisation par fois excessive de ces animaux - de compagnie ou d'élevage – peut être aussi dans beaucoup de cas, une source de germes néfastes à degré variable pour la santé animale ou humaine.

Le manque d'information et l'ignorance de certains éleveurs leurs permet l'application courante et l'usage excessif d'agents antimicrobiens dans les élevages des animaux qui, bien qu'ils offrent de nombreux avantages dans la production du bétail, conduisent en revanche, à la sélection des souches microbiennes résistantes ; c'est le cas de nombreuses souches de staphylocoques d'origine animale [51,62,77,98,128]. La résistance aux effets des médicaments antimicrobiens est un sérieux problème qui coûte des vies, de l'argent et menace notre capacité à traiter les infections chez les humains et chez les animaux.

Le développement de nouveaux agents thérapeutiques s'avère indispensable pour lutter contre ces germes résistants. Dans ce but, l'investigation des plantes médicinales très diversifiées et très répondues chez nous semble être un potentiel inestimable pour la découverte de nouvelles substances. Les plantes étaient et sont toujours, une source essentielle de médicaments.
Aujourd'hui encore, une majorité de la population mondiale, plus particulièrement dans les pays en voie de développement, se soigne uniquement avec des remèdes traditionnels à base de plantes.
De l'Aspirine au Taxol, l'industrie pharmaceutique moderne elle même s'appuie encore largement sur la diversité des métabolites secondaires végétaux pour trouver de nouvelles molécules aux propriétés biologiques inédites.

Ainsi, les huiles essentielles d'un nombre de ces métabolites représentent beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives. Dotée de toute une gamme de propriétés biologiques, elles sont utilisées à la manière d'antibiotiques ou d'autres préparations chimiques pour leurs fortes actions bactériennes fongicides et verucides [8]. D'un autre côté, grâce à leurs propriétés antioxydantes, les huiles essentielles ont trouvé plusieurs applications dans différents domaines dont l'industrie alimentaire.
Actuellement, les huiles essentielles font l'objet d'études pour leur éventuelle utilisation alternative pour le traitement des maladies infectieuses et pour la protection des aliments contre l'oxydation.

Dans ce contexte, nous avons réalisé notre travail dont les l'objectif visent à :

- Identifier les différents composants des quatre huiles essentielles d'Origanum vulgare, Lavandula stoechas, Mentha pulegium et Achillea odorata extraites par hydrodistillation.
- Evaluer l'effet antimicrobien *in vitro* de ces principes actifs sur des germes isolés à partir de produits pathologiques des animaux domestiques.
- Essayer d'exploiter les propriétés antibactériennes de la phase volatile de l'huile essentielle.
- Evaluer l'activité antiradicalaire des huiles essentielles.

# Etude bibliographique

# Les huiles essentielles

*« Ce que voient les yeux n'est pas le remède ; lorsque la distillation aura transformé le végétal, alors le remède deviendra manifeste » Paracelse .*

## I. Définition

Selon la définition de la norme française NF T 75-006, l'huile essentielle est : « un produit naturel obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par hydrodistillation. L'huile essentielle est en suite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques » [4]. Les huiles essentielles sont des mélanges odorants, complexes et variables de composés volatiles. Ils sont stables à température ambiante si elles sont conservées de manière adéquate, à l'abri de l'oxydation et de la polymérisation provoquée par l'air, par la lumière et par les variations de température.

## II. Historique

L'utilisation des huiles essentielles remonte aux plus anciennes civilisations : tout d'abord dans l'Orient et le Moyen Orient et par la suite au nord de l'Afrique et en Europe [44].

Les propriétés bénéfiques des essences sont connues depuis bien longtemps. Des textes Akkadiens datant de 4000 ans nous apprennent qu'à cette époque on maîtrisait déjà l'art de fabriquer des baumes, des huiles et des eaux parfumées. Des papyrus égyptiens datant de 2800 ans parlent d'huiles fines, d'aromates pour embaumer leurs morts et de parfums de choix. La Chine, l'Inde et la Perse ont une longue tradition et une connaissance de plus de 2000 ans dans les soins de beauté et la guérison par les huiles essentielles, et dans ces pays, la distillation est connue et maîtrisée depuis de très longues années.

Dans l'histoire moderne, les vertus des huiles essentielles occupent une place de plus en plus importante dans différents domaines dont la thérapie, la cosmétologie, agroalimentaire, parfumerie…

## III. Répartition :

Les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs. Les genres capables d'élaborer les constituants qui les composent sont répartis dans une cinquantaine de familles [16].

Le tableau 1 indique seulement quelques familles de plantes riches en huiles essentielles et des exemples de genres et d'espèces appartenants à ces familles [45].

**Tableau 1** : Exemples de familles et d'espèces riches en huiles essentielles [45].

| Familles | Espèces |
|---|---|
| **Cupressaceae** | *Cupressus lusitanica.* |
| | *Juniperus virgiana* |
| | *Thuja occidentalis* |
| **Pinaceae** | *Abies balsamea* |
| | *Picea mariana* |
| **Lamiaceae** | *Melissa officinalis* |
| | *Hyssopus officinalis* |
| | *Lavandula angustifolia* |
| | *Mentha piperita* |
| **Asteraceae** | *Achillea millefolium* |
| | *Artemisia absinthium* |
| **Lauraceae** | *Laurus nobilis* |
| | *Sassafras officinalis* |
| **Myrtaceae** | *Eucalyptus citriodora* |
| **Verbenaceae** | *Lippia citriodora* |
| **Rutaceae** | *Citrus limon* |

## IV. Localisation :

Les sites producteurs des huiles essentielles peuvent se rencontrer dans tout type d'organe : fleurs (origan), feuilles (citronnelle, eucalyptus), écorces (cannelier), bois (bois de rose, santal), racines (vétiver), rhizomes (curcuma, acore), fruits (anis, badiane) ou graines (carvi, muscade) [15]. Ces molécules odorantes, classées parmi les métabolites secondaires sont produites par diverses structures spécialement différenciées [92,95]. Nous pouvons distinguer :

-Les poils glandulaires épidermiques rencontrés souvent chez les Lamiaceae, Geraniaceae et Rutaceae. Ils produisent des essences dites superficielles.

-Les organes sécréteurs sous-cutanés comprenant des cellules et des poches sécrétrices qui sont généralement disséminées au sein du tissu végétal chez les Myrtaceae, Auranthiaceae, ainsi que des canaux sécréteurs chez les Ombelliferaceae.

## V. Composition chimique des huiles essentielles.

Les principales familles des produits naturels qui se trouvent comme constituants chimiques des huiles essentielles appartiennent de façon quasi exclusive à deux groupes de composés odorants. Il s'agit des terpènes d'une part, et qui sont prépondérants dans la plupart des essences, et des dérivés du phénylpropane d'autre part.

### 1. Les composés terpéniques :

Sont des produits naturels issus d'une voie métabolique secondaire, et formés de l'assemblage d'un nombre entier d'unités pentacarbonés $(C_5)n$ ramifiées dérivées du 2 méthylbutadiène ( unité isoprénique ) figure1 .

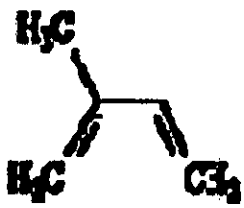
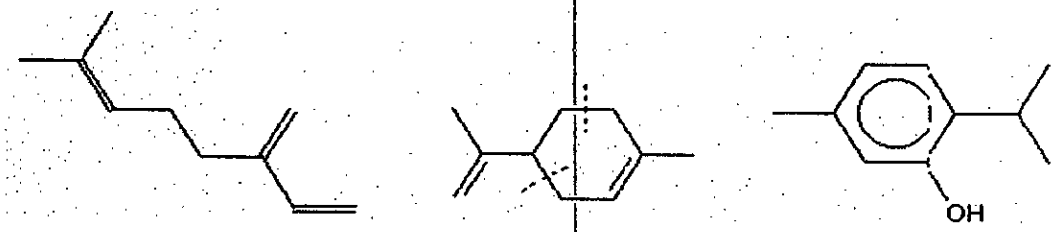


**Figure1** : unité isoprénique

Suivant le nombre entier de ces unités, nous pouvons réaliser la classification suivante :

**Pour n = 2 : les monoterpènes**

Ce sont des hydrocarbures en $C_{10}$ (figure 2). Ils peuvent être acycliques, monocycliques, bicycliques. A ces terpènes se rattachent un certain nombre de produits naturels à fonctions chimiques spéciales, tel que alcools, aldéhydes ...

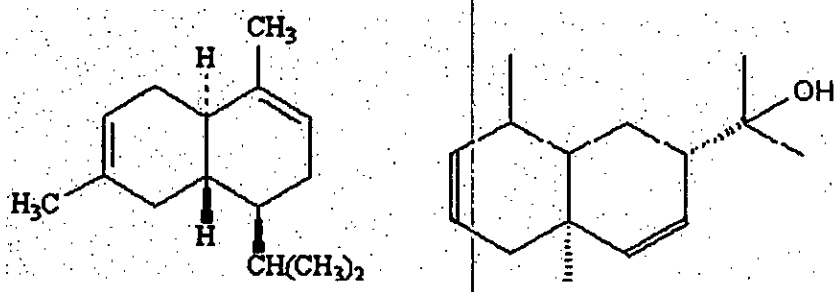



**B- Myrcène** **Limonène** **Thymol**

**Figure2:** Exemples de monoterpènes.

**Pour n = 3 : les sesquiterpènes.**

Ce sont des hydrocarbures en $C_{15}$ (figure 3). Les variations structurales dans cette série sont de même nature que dans le cas précèdent : alcools, aldéhydes, cétones ...
Par rapport aux monoterpènes, les sesquiterpènes offrent un plus grand nombre de possibilités de cyclisations, ce qui augmente la diversité structurale de façon considérable.

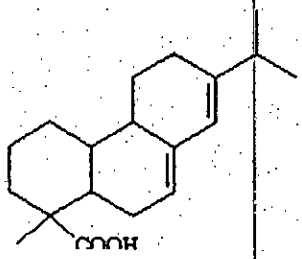



**Cadinene** **Eudesmol**

**Figure3:** Exemples de sesquiterpènes.

**Pour n = 4 : les diterpènes.**

Ce sont des dérivés des hydrocarbures en $C_{20}$ (figure 4). Ces composée, à point d'ébullition élevée, se rencontrent surtout dans les résines.




**Acide abiétique**

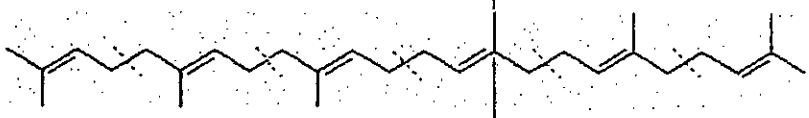
**Figure4 :** Exemple de diterpènes.

**Pour n = 5 : les sesterpènes .**

Ce sont des dérivés d'hydrocarbures en $C_{25}$.

**Pour n = 6 : les triterpènes :**

Ces composés en $C_{30}$ (figure 5) sont très répandus, notamment dans les résines, à l'état libre, estérifiés, ou sous forme hétérosidique.



**Squalène**

**Figure5:** Exemple de triterpènes.

**Pour n = 8 : tétraterpènes**

Les caroténoïdes sont des composés importants de ce groupe. Ils sont des composants largement répandus chez les animaux et les végétaux.

**Les polyterpènes :**

Ce sont des macromolécules, composées d'un grand nombre d'unités d'isoprène. Le caoutchouc naturel (figure 6) en est un exemple de ce groupe.

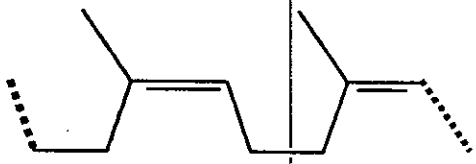


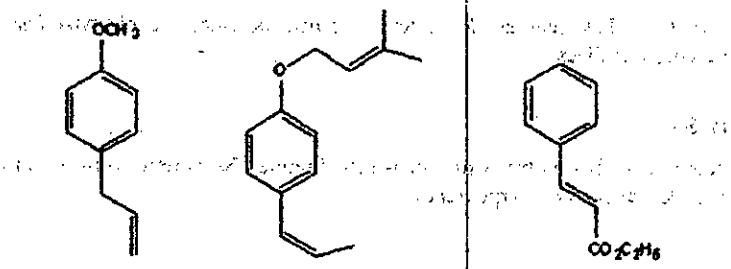
**Figure6 :** Caoutchouc naturel.

Dans une huile essentielle, nous retrouverons presque exclusivement les terpènes les plus volatiles, c'est à dire ceux dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée : mono et sesquiterpènes [15].

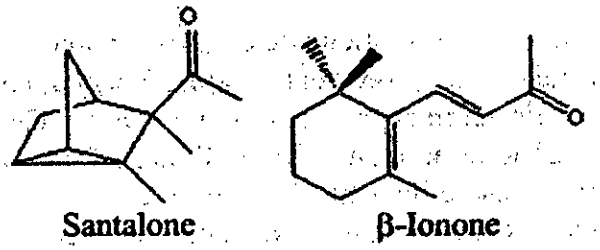
**2. Les dérivés du phénylpropane :**

Beaucoup moins fréquents que les terpenoides, ces dérivés sont issus d'une voie métabolique secondaire dite de l'acide shikimique.

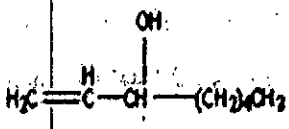
Les composés de la dégradation d'acides gras et les composés de la dégradation des terpènes (figure7) sont aussi fréquemment retrouvés dans les huiles essentielles [46].



**Méthvl chavicol** **cis-Foeniculine** **Cinnamate d'éthyle**



Santalone β-Ionone



Octén-3-ol

$CH_3(CH_2)_{12}CH_2OH$

n-Tétradécanol

**Figure7 :** Phénylpropanes et composées de dégradation d'acides gras et de terpènes [46].

Le nombre des molécules chimiquement différentes qui constituent une huile essentielle est variable. La plupart sont poly-moléculaires, c'est à dire composées d'une grande diversité de composés (jusqu'à 500 molécules différentes dans l'huile essentielle de Rose). A coté des composés majoritaires (entre 2 et 6 généralement), on retrouve des composés minoritaires et un certain nombre de constituants sous forme de traces.

Il existe quelques huiles dites mono-moléculaires, telle le Bois de Rose (*Aniba rosaeodora*), la Menthe pouliot (*Mentha pulegium*) ou la Gaulthérie couchée (*Gaulteria procubens*) qui sont constituées presque exclusivement d'une molécule majoritaire.

La sauge sclarée (*Salvia sclarea*), le citron (*Citrus reticulata*) et le Clou de Girofle (*Eugenia caryophyllus*) sont bi- et tri-moléculaires.

## VI. Biosynthèse des huiles essentielles :

Comme nous l'avons précédemment vu, les huiles essentielles sont constituées principalement de deux groupes de composés. Le groupe des terpenoides et celui des composés aromatiques dérivés du phenylpropane.

### 1. Les terpénoides :

Les terpénoides constituent une vaste famille de substances naturelles [24] dont le squelette carboné est formé d'unité pentacarboné (c) ramifiée, dérivée du 2-méthylbutadiène (unité isoprénique) figure1.

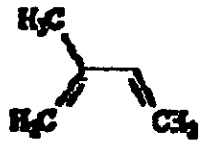


**Figure1 :** unité isoprénique

L'existence des motifs isopréniques a été envisagée pour la première fois par Wallach en 1887 qui fut le premier à proposer que des condensations successives d'unités d'isoprène de manière (tête-à-queue) donnent des composés chimiques à n fois cinq atomes de carbone ($C_{5n}$) [126].

Cet aspect a été développé en 1953 par Ruzika, qui proposa un concept appelé règle isoprénique biogénétique, la règle de Ruzika [108], complétée ensuite par Lynen et al [81] et Bloch et al [11].

Les diphosphates d'isopentényle (figure8) (IPP) **5** et de diméthylallyle (DMAPP) **6**, équivalents

biologiques de l'isoprène, sont les précursseurs communs de tous les isoprénoides et peuvent s'isomériser grâce à une enzyme, l'IPP isomérase [2, 18, 61, 80, 100, 101].

Les études sur la formation de ces deux molécules spécialement dans les tissus du foie ont permis la découverte, dans les années 50, de la voie du mévalonate (MVA), longtemps considérée comme l'unique voie de biosynthèse des isoprénoides. Cependant, une autre voie alternative indépendante au mévalonate a été découverte chez plusieurs organismes dont les plantes supérieures. C'est la voie de 2-C-méthyl-D-érythritol 4 phosphate ou la voie du MEP.

**1.1. La voie du mévalonate ou la voie du MVA :**

L'acide mévalonique **4** provient de l'acétyle CoA **1**. La première étape dans cette voie consiste en la condensation de deux molécules d'acétyle CoA pour former de l'acétoacétyl CoA **2** (figure8).La condensation d'une troisième molécule d'acétyle CoA conduit à la formation du B hydroxy-B méthylglutaryl CoA(HMG CoA) **3**. Celui ci est ensuite réduit et donne l'acide mévalonique **4**. L'acide mévalonique est par la suite phosphorylé puis converti en diphosphate de mévalonate, qui à son tour transformé en IPP **5**. Le DMAPP **6** est formé ensuite par isomérisation de l'IPP.

Cette cascade de réactions biosynthétiques décrite dans la figure 8 débutant de l'acétyle CoA et conduisant à l'IPP est appelée voie du mévalonate.

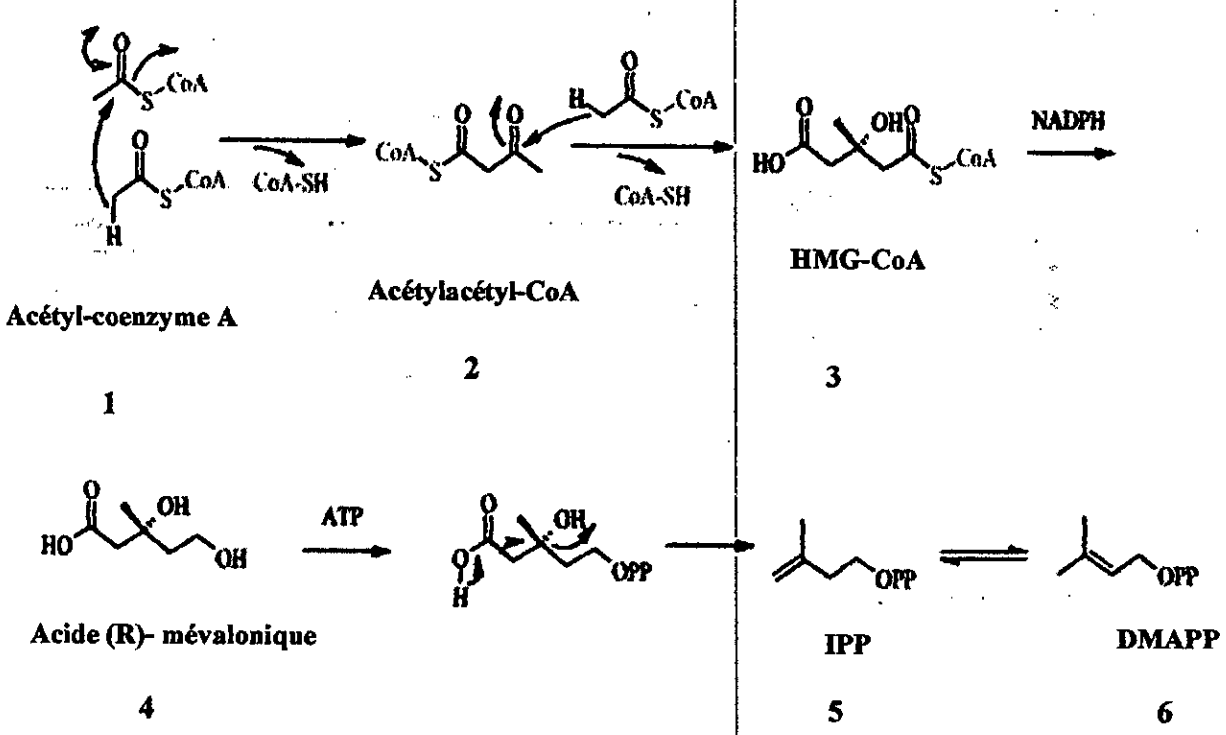



**Figure8 :** Biosynthèse du diphosphate d'isopentényle selon la voie du mévalonate

**1.2. La voie de 2-C-méthyl-D-érythritol 4 phosphate ou la voie du MEP :**

Cette nouvelle voie de biosynthèse indépendante du mévalonate a été découverte suite à de nombreuses expériences d'incorporation de précurseurs marqués chez les eubactéries, les algues et les plantes supérieures [104, 106, 112, 113].

Les deux précurseurs de cette voie sont le pyruvate **7** et le glyceraldehyde 3-phosphate **8**(figure9).Le premier substrat formé le 1-désoxy-D-xylulose 5 phosphate (DXP) **9** subit un réarrangement et une réduction pour fournir le 2-C- métyhl-D-érythritol 4 phosphate (MEP) **10**. Ce tétrol présente déjà le motif isoprénique à 5 atomes de carbone. La suite des réactions correspondent à des modifications du MEP qui aboutiront à la formation du 2-C-méthyl-D-érythritol 2,4 – cyclodiphsphate (MECDP)**13**.Ce composé est en suite transformé en diphosphate de (E)- 4 – hydroxy 3- métylbut -2 - ényl (HMBPP)**14**. Le dernier précurseur de cette voie est finalement transformé soit en diphosphate d'isopentényle **5** soit en diphosphate de dimethylallyle **6**.

Toutes ces étapes constituent la voie de biosynthèse des isoprénoides selon la voie du MEP [38,103,105].

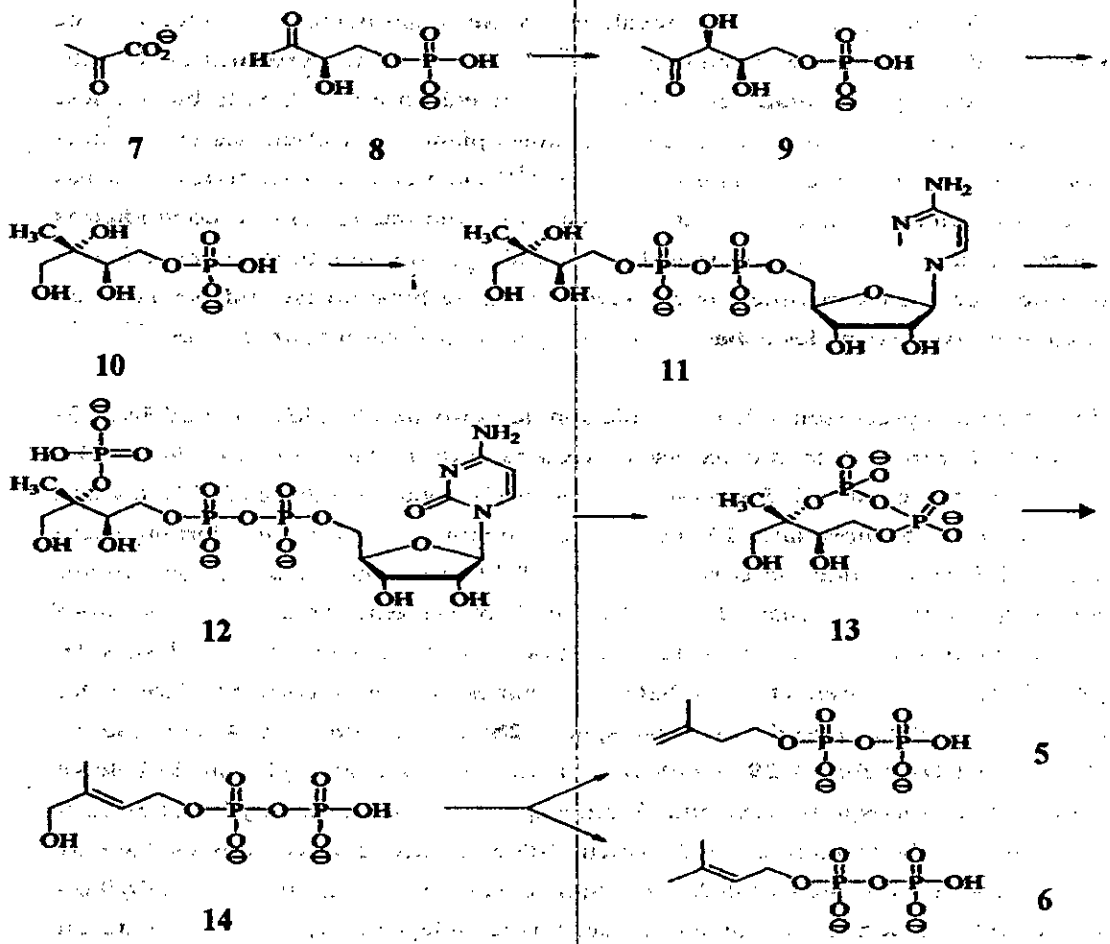



**Figure 9** : Biosynthèse du diphosphate d'isopentenyle et de dimethylallyle selon la voie du 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate.

Après la formation de L'IPP et du DMPP (soit selon la voie du MVA ou du MEP), une condensation entre ces deux molécules mène au diphosphate de géranyle (GPP,$C_{10}$) **15**, précurseur des monoterpènes ( figure10). Une condensation supplémentaire de type tête- queue de l'IPP sur le GPP conduit au diphosphate de farnésyle (FPP,$C_{15}$) **16**, précurseur des sesquiterpènes. Une élongation supplémentaire du diphosphate de farnésyle avec une entité d'IPP, conduit au diphosphate de géranylgéranyle (GGPP) **17**, précurseur des diterpènes et des caroténoides. Tandis qu'une condensation " tête-à-tête" de deux molécules de diphosphate de farnésyle aboutit au squalène (C30) **18**, précurseur des triterpènes, des stérols et des hopanoides. Enfin, les composés isopréniques en $C_{5n}$ précurseurs des polyprénols et des quinones, proviennent de condensations successives de l'IPP sur le GGPP **17**. Les prényles transférases permettent l'élongation des chaînes prényles par addition d 'une molécule d'IPP [93]. Ces précurseurs acycliques isopréniques **18** peuvent subir différentes réactions chimiques (oxydations, cyclisations suivies de transpositions), ce qui permet de dénombrer à ce jour plus de 22000 isoprénoides [24].

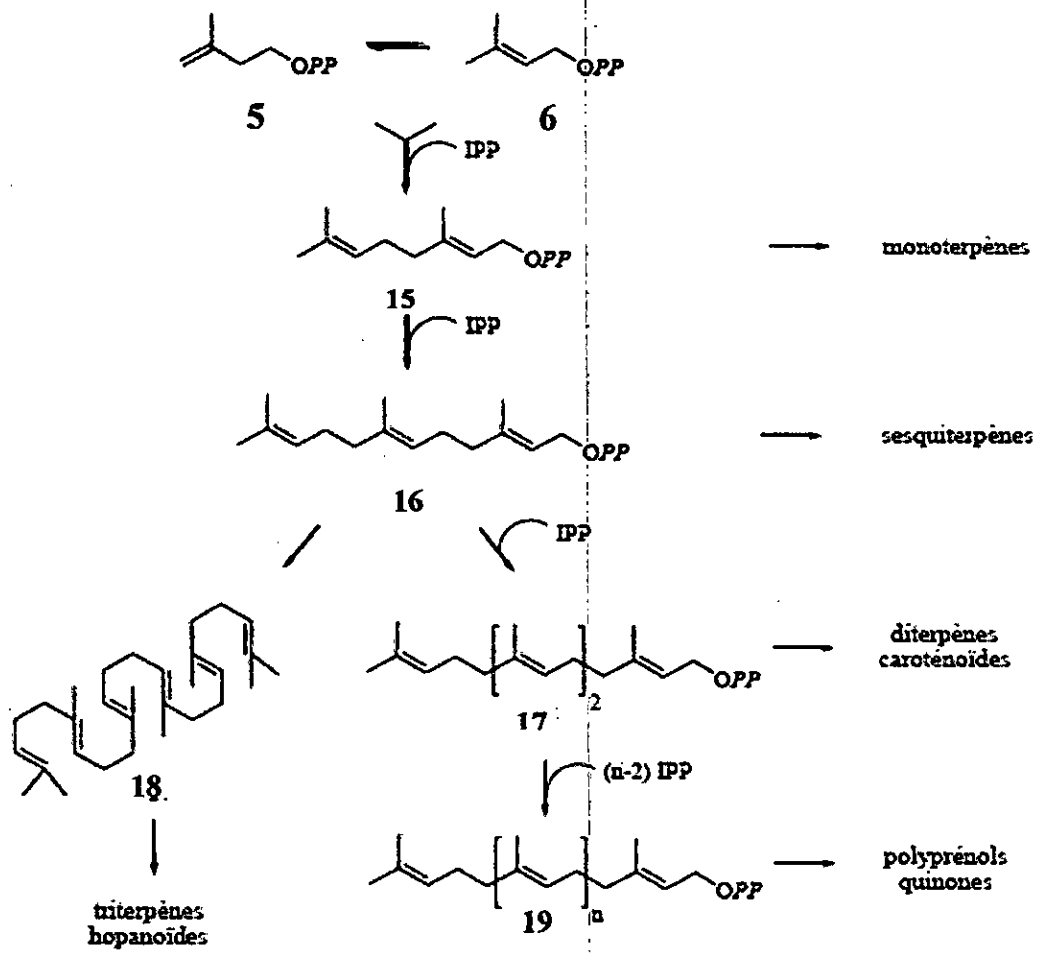



**Figure 10 :** Biosynthèse des isoprénoides à partir du diphosphate d'isopentényle (IPP).

**2. Dérivés du phenylpropane :**

Les dérivés du phénylpropane (C6 – C3) sont beaucoup moins fréquents que les composés terpéniques.
Ces dérivés sont issus d'une autre voie métabolique dite de l'acide shikimique.

**VII. Applications thérapeutiques et écologiques.**

Les huiles essentielles sont connues et utilisées depuis plus de 6000 ans. Ces extraits odorants de plantes ont de multiples vertus thérapeutiques. En plus de leurs activités bactéricides et fongicides, qui leur permettent de trouver des applications dans les domaines phytosanitaire et agroalimentaire [82,131], elles ont la particularité d'avoir des effets psychophysiologiques [121]. Certaines sont stimulantes : Basilic, Menthe, Pin, et d'autres sont sédatives : Bergamote, Camomille, Géranium et Citron [16,83].

Les isoprénoides des huiles essentielles possèdent également un rôle écologique lors des interactions végétales, comme agents allélopathiques, c'est à dire inhibiteurs de la germination [73], mais aussi lors des interactions végétal-animal, comme agents de protection contre les prédateurs tels que les insectes [22, 73].Ils interviennent également, par leurs odeurs caractéristiques, dans l'attraction de pollinisateurs [73, 96].

**VIII. Activité Antimicrobienne :**

**1. Biocidie et Biostase :**

A la manière des agents chimiques, on distingue deux sortes d'effets des huiles essentielles sur les microorganismes une activité létale (biocidie) et une inhibition de la croissance (biostasie).
L'activité des huiles essentielles est souvent assimilée à une activité bactériostatique. Cependant plusieurs études ont montré que certains constituants chimiques des huiles essentielles ont des propriétés bactéricides [21, 66, 71, 127] et fongicides [52].

Plus spécifiquement, plusieurs études ont montré l'apparition de fuites d'ions potassium K+ de cellules microbiennes (*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*) en contact avec du Tea-tree (*Melaleuca alternifolia*). Il s'agit de la toute première indication de dégâts irréversibles au niveau de la membrane. Des composés isolés tels le thymol et le carvacrol rendent la membrane des bactéries

perméable, prémice de leur mort [57, 71]. La faculté de perturber la perméabilité de la cellule membranaire, accompagnée de la perte de l'osmose chimique sont bien la preuve d'une activité létale de certaines huiles essentielles [28].

Une revue des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) et des Concentrations Minimales Bactéricides (CMB) pour quatre variétés de Thym portant sur quatorze souches bactériennes (dont *Staphylococcus aureus*) a montré que dans la majorité des expériences, les valeurs des CMI sont identiques aux CMB. Ceci indique que les huiles essentielles incriminées sont bactéricides [26]. Des clichés de microscopie électronique illustrent ces études en montrant les dommages de cellules des microorganismes suivants:

1. *Staphylococcus aureus* en contact avec des huiles essentielles riches en monoterpénols et en phénols [44].
2. des cellules d'*Escherichia coli* visiblement très endommagées par l'Origan compact qui collapsent après 1 minute de contact [17].
3. la lyse de cellules fongiques provoquée par la Citronnelle de Java, *Cymbopogon nardus* [35].

**2. Souches microbiennes :**

La sensibilité des microorganismes peut varier selon le germe testé car une huile essentielle peut être biocide vis-à-vis de certaines souches, biostatique vis-à-vis d'autres ou n'avoir aucun effet [58]. C'est pour cela qu'il est important de mentionner la dénomination complète, le Gram des microorganismes ainsi que l'espèce botanique et le chémotype de l'huile essentielle.

Les bactéries à Gram positif seraient plus résistantes aux huiles essentielles que les bactéries à Gram négatif [130]. Cette affirmation n'a cependant pas été confirmée par d'autres travaux. La susceptibilité des bactéries est en effet indépendante du Gram [37] ou dépend des huiles essentielles utilisées [35].

Il semblerait tout de même qu'en règle générale, les bactéries à Gram négatif soient plus résistantes aux huiles essentielles. Ces résultats sont confirmés par de nombreuses expériences [26, 35].

**3. Rôle de l a méthode dans la détermination de l'activité :**

Selon la littérature, la diffusion sur gélose et la dispersion en microatmosphères mettent en évidence l'activité biostatique [58], et les mélanges en bouillon nutritif, l'activité biocide [110].

Mais des études récentes se sont affranchies de la méthodologie et des essais gélosés peuvent aussi bien démontrer des effets biocides [115].

**4. Association d'huiles essentielles :**

Les effets antimicrobiens des associations d'huiles essentielles, comme pour les associations d'antibiotiques, sont définies selon quatre interactions possibles :

**Indifférence** : l'activité d'une huile essentielle n'est pas affectée par l'autre.

**Addition** : l'effet de l'association est égal à la somme des effets de chaque huile essentielle étudiée isolément, à la même concentration que dans l'association.

**Synergie** : l'effet est significativement supérieur à la somme de chaque huile essentielle étudiée isolément, à la même concentration.

**Antagonisme** : l'association diminue l'activité de l'une ou l'autre des huiles essentielles. Elle est inférieure à la somme des effets de chaque huile essentielle prise séparément.

**5. Activité liée à la composition chimique :**

L'activité biologique d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique, les groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) et les possibles effets synergiques entre les composants. Ainsi la nature des structures chimiques qui la constituent, mais aussi leurs proportions jouent un rôle déterminant.

L'activité des huiles essentielles est souvent réduite à l'activité de ses composés majoritaires, ou ceux susceptibles d'être actifs. Evalués séparément sous la forme de composés synthétiques, ils confirment ou infirment l'activité de l'huile essentielle de composition semblable. Il est cependant probable que les composés minoritaires agissent de manière synergique. De cette manière, la valeur d'une huile essentielle tienne à son « totum », c'est à dire dans l'intégralité de ses composants et non seulement à ses composés majoritaires [69].

Les molécules réputées actives sont des terpénoïdes, car les hydrocarbones saturés et les acétates ioniques sont inactifs, par la nature même de leur faible capacité de liaisons hydrogène et de leur faible solubilité [49]. L'effet des terpènoïdes sur des membranes bactériennes isolées suggère que leur activité est fonction des propriétés lipophiles des constituants terpéniques, la nature des groupes fonctionnels, leur solubilité en phase aqueuse et la stéréochimie de la molécule [37].

Les composés chimiques de plus grande efficacité et à plus large spectre sont des phénols (thymol,

carvacrol et eugénol) des alcools, (α-terpineol, terpinen-4-ol, linalol), des aldéhydes, des cétones et plus rarement des terpènes [23,26, 37,67,68]. Les principaux terpénoïdes actifs sont illustrés dans le tableau 2.

**Tableau 2 :** Structure générale des principaux agents antimicrobiens.

| | | |
|---|---|---|
| OH<br>**ALCOOLS** | OH<br>**PHENOLS** | CHO<br>**ALDEHYDES** |

## IX. Activité antioxydante des huiles essentielles

Les huiles essentielles ont également montré des propriétés antioxydantes qui associées à l'activité antimicrobienne permettrait leur utilisation pour la conservation des aliments ou le développement de substances pharmacologiques. Plusieurs études ont confirmé cette importante activité pour plusieurs extraits [7, 29, 30, 31, 107] notamment le cas de l'huile essentielle du genre Thymus qui témoigne d'une activité antioxydante non négligeable [13].

La vitamine E, composé isoprénoide est aussi connue pour son action antioxydante, elle stabilise *in vitro* les acides gras insaturés et les protège en empêchant leur péroxydation par piégeage des radicaux libres.

## X. Caractérisation des huiles essentielles :

L'analyse des huiles essentielles est une étape importante qui malgré les progrès constants des différentes techniques de séparation et d'identification, demeure toujours une opération délicate nécessitant la mise en œuvre simultanée ou successive de diverses techniques. Parmi ces méthodes d'analyses on peut citer :

**1. La chromatographie en phase gazeuse (CPG) :**

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition [3]. Elle permet de séparer les constituants d'un mélange selon leur partage entre deux phases dont l'une est fixe ou stationnaire et l'autre mobile et gazeuse. La phase stationnaire, déposée sur un support inerte, est placée dans une colonne, parcourue par la phase mobile. Les deux phases sont en contact intime. Dans ces conditions, l'équilibre d'un mélange qui se partage entre les deux phases en un endroit donné, est constamment déplacé par l'apport de gaz. Or, pour chacun des constituants, le partage est différent, l'un sera plus soluble et s'enrichira dans la phase stationnaire, l'autre plus volatil s'enrichira dans la phase gazeuse. La CPG est la technique usuelle dans l'analyse des huiles essentielles. Elle permet d'opérer la séparation de composés volatils de mélanges très complexes et une analyse quantitative des résultats à partir d'un volume d'injection réduit [3].

Pour chacun des composés, deux indices de rétention polaire et apolaire, peuvent être obtenus. Ils sont calculés à partir des temps de rétention d'une gamme étalon d'alcanes ou plus rarement d'esters méthyliques linéaire, à température constante (indice de Kovats) [65] ou en programmation de température (indice de rétention) [125]. Ils sont ensuite comparés avec ceux de produits de référence (mesurés au laboratoire ou décrits dans la littérature). Toutefois, il est fréquent d'observer des variations, parfois importantes, lorsque l'on compare les indices de rétention obtenus au laboratoire et ceux de la littérature (en particulier sur colonne polaire).C'est pourquoi la comparaison des indices sur deux colonnes de polarité différente est nécessaire.

Malgré tout, ceci ne peut suffire à une bonne identification, sans l'apport du couplage entre la CPG et une technique d'identification spectroscopique : en générale la spectrométrie de masse (CPG/SM).

**2. Le couplage chromatographie en phase gazeuse CPG/ spectrométrie de masse SM :**

L'utilisation de la CPG seule ne peut suffire à une bonne identification, sans l'apport du couplage entre la CPG et une technique d'identification spectroscopique, en général la spectrométrie de masse (CPG/SM).

La spectrométrie de masse désigne une méthode d'analyse qui repose sur la détermination des masses des espèces atomiques ou moléculaires de l'échantillon analysé, ce qui permet de recueillir des informations sur sa nature, sa composition et même sur sa structure.

Une très petite du composés à analyser, sous forme convenable est ionisée : les espèces porteuses de charge électrique qui en résultent sont soumises à l'action d'un champ magnétique et/ou électrique suivant l'appareil. L'étude des trajectoires suivies, dans une enceinte ou règne un très bon vide, permet de le rapport masse/ charge des ions, donc éventuellement leur nature. Cette méthode détruit le composé à analyser. Le résultat de l'analyse est représenté par un graphe appelé spectre de masse qui représente l'abondance statistique de chaque type d'ion formé, suivant son rapport masse/charge dans l'ordre croissant des masses.

La combinaison de ces 2 techniques complémentaires, est applicable à l'analyse d'un grand nombre de substances organiques, aussi bien gazeuses que liquides.

Ainsi le couplage CPG/SM est la technique la plus utilisée dans le domaine des huiles essentielles. Il permet de connaître, dans la grande majorité des cas, la masse moléculaire d'un composé et d'obtenir des informations structurales relatives à une molécule à partir de sa fragmentation [25,78].

# Etude expérimentale

# Matériel et méthodes

# I. Matériel et méthodes :

## 1. Matériel végétal :

Nous présentons ci-dessous les informations relatives à la sélection, la récolte, l'extraction ainsi que l'analyse par CPG / SM des huiles essentielles des quatre plantes aromatiques.

### 1.1 Sélection des plantes :

Les quatre plantes aromatiques qui ont été choisies pour l'extraction des huiles essentielles sont : *Origanum vulgare*, *Lavandula stoechas* et *Mentha pulegium* de la famille des Lamiaceae et l'espèce *Achillea odorata* de la famille des Asteraceae. L'utilisation de ces plantes en médecine traditionnelle était le principal critère de notre choix.

#### 1.1.1 *Origanum vulgare* :

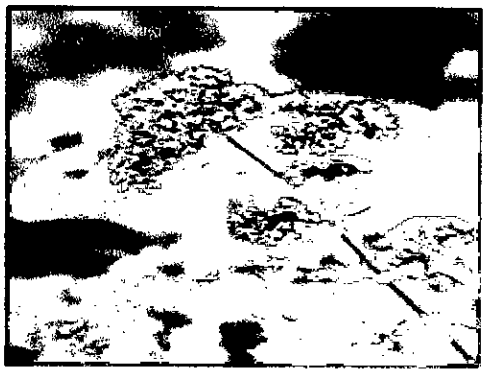


**Figure 11:** plante d'*Origanum vulgare*.

**a. Description botanique et principaux constituants :**

*Origanum vulgare* (figure11) appartient à l'ordre des Lamiales, famille des Lamiaceae. C'est une plante vivace de 20 à 60 cm, très odorante. Les tiges sont dressées, rougeâtres et velues avec des feuilles vertes, ovales, opposées et portées par un pétiole long de 5 à 10 mm. Les fleures ont une couleur rose pale, groupées en inflorescence à l'extrémité des rameaux. Le fruit est constitué de 4 akènes.

**a. Description botanique et principaux constituants :**

*Mentha pulegium* (figure12) appartient à l'ordre des Lamiales, famille des Lamiaceae. C'est une plante herbacée, vivace par ses rhizomes, basse, de 10 à 55 cm de haut, fréquente dans les milieux humides, qui exhale une forte odeur aromatique. Les tiges feuillées, quadrangulaires, émettent très facilement des racines adventives. Les tiges florifères sont plus au moins dressées. Les feuilles, opposées, petites sont ovales et munies d'un court pétriole. Les fleures, qui apparaissent l'été, sont rose lilas, par fois blanches, et sont groupées à l'aisselle des feuilles en glomérules.

La *Menthe pouliot* ou *Mentha pulegium* est une plante très riche en essence aromatique. La principale caractéristique de l'huile essentielle de la plante est sa forte teneur en pulégone (Plus de 85 %) [9]. Le menthol, le limonène et le dipentène sont aussi présents dans la composition de l'huile essentielle. La plante contient également des tanins, des matières cellulosiques et pectiques, du sucre, etc. .....

**b. Utilisation thérapeutique :**

Communément appelé pennylroyal, cette plante est traditionnellement employée comme carminative, et antispasmodique [5,48,90,129]. L'huile essentielle est utilisée pour soulager les troubles nerveux et hystériques, comme antiseptique [90], contre le fourmillement et l'irritation [5,129] et pour soulager les éruptions cutanées [48, 50,90, 129].

**1.1.3. *Lavandula stoechas* :**

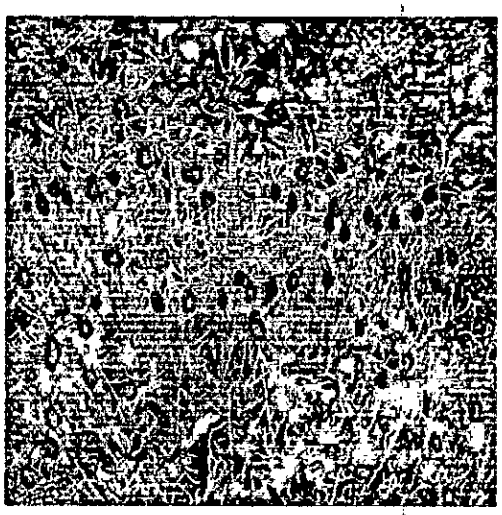


**Figure 13: *Lavandula stoechas*.**

**a. Description botanique et principaux constituants :**

Le genre *Lavandula* (figure13) est un membre important de la famille des Lamiaceae. Les espèces de *Lavandula* sont largement distribuées dans la région méditerranéenne.
L'espèce *Lavandula stoechas* est un sous arbrisseau toujours vert, vivace atteignant 20 à 40 cm de hauteur, à tige quadrangulaire, feuillé jusque dans sa partie supérieure. La tige porte à son extrémité, une inflorescence en épi carré terminé par un toupet de longues bractées violettes. Les fleurs pourpres, sont petites, situées à l'aisselle de courtes bractées et hermaphrodites.

La plante renferme une huile essentielle dont le fenchone est sa substance principale (représente 45 à 50 %). Viennent ensuite par ordre d'importance, du camphre, des monoterpènes et du verbénone. Les glandes sécrétrices d'huile essentielle sont réparties sur l'ensemble de la plante, abondant surtout sur le calice. La *Lavandula stoechas* contient également d'autres principes actifs dont les tanins.

**b. Utilisation thérapeutique :**

L'intérêt médical de la plante est bien documenté [53,97] et les drogues préparées à partir de cette plante sont enregistrées dans beaucoup de pharmacopées.
La plante est employée comme expectorant, antispasmodique, carminative et en cas de blessures.
L'huile essentielle obtenue à partir de ses brindilles fleurissantes est employée comme remède contre les infections coliques, pour soulager le mal de tête et pour le nettoyage des blessures [6, 60,109].

**1.1.4. *Achillea odorata* :**

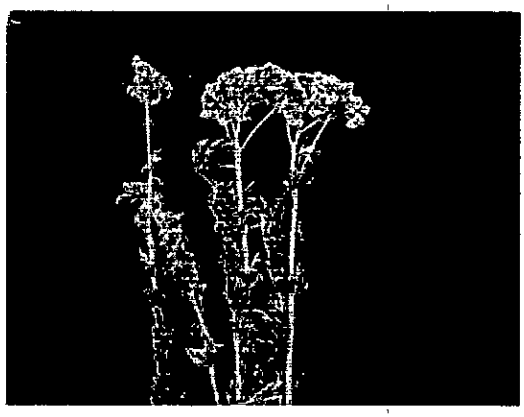


**Figure 14 :** *Achillea odorata*

**a. Description botanique et principaux constituants :**

*Achillea odorata* (figure14) apparient à l'ordre des Astérales, de la famille des Asteraceae. C'est une plante herbacée vivace d'environ 30 cm d'hauteur. Comme pour toutes les composées, la fleur est un capitule. Très nombreux sur la plante, ces capitules sont groupés en inflorescence appelée corymbe. Les tiges sont régides, érigées portant les corymbes de petits capitules blancs à centre crème. Les feuilles sont persistantes, duveteuses de couleurs grises très odorantes et très découpées. *Achillea odorata* est une plante qui s'étend très rapidement et peut devenir envahissante. En revanche, elle forme un magnifique couvre-sol.

Les données bibliographiques concernant cette espèce étaient limitées. Il existait même des espèces qui n'ont pas été étudiées auparavant.

**b. Utilisation Thérapeutique :**

Les différentes espèces d'*Achillea* étudiées sont connues pour leurs propriétés antiseptiques et la prévention de certaines infections [86], certains d'entre elles ont été utilisés comme ingrédients dans les préparations médicinales et cosmétiques. Ainsi, plusieurs études et recherches se sont penchées sur l'étude de la composition et / ou les propriétés biologiques des huiles essentielles de différentes espèces d'*Achillea*.

**1.2. Récolte des plantes :**

Les espèces choisies, voir tableau 3, ont été collectées séparément dans leur habitat naturel. Les récoltes ont été effectuées à Jijel dans la région de Chehna pour *Origanum vulgare* (Lamiaceae), et *Lavandula stoechas* (Lamiaceae), dans la région de Taher pour *Mentha pulegium* (Lamiaceae) et dans la région de Bazoul pour l'espèce *Achillea odorata* (Asteraceae). Les plantes ainsi récoltées ont été acheminées au laboratoire de pharmacologie et de phytochimie de la faculté des Sciences de l'Université de Jijel où l'extraction des huiles essentielles a eu lieu.
La détermination botanique des espèces a été réalisée par les botanistes de la faculté des Sciences, Université de Jijel.

**Tableau 3 :** Espèces utilisées dans l'expérimentation.

| Nom botanique | Famille | Région de récolte | Période de récolte |
|---|---|---|---|
| *Origanum vulgare* | Lamiaceae | Chehna | Le mois de Juin 2005 |
| *Lavandula stoechas* | Lamiaceae | Chehna | La dernière semaine d'Avril 2005. |
| *Mentha pulegium* | Lamiaceae | Taher | La dernière semaine de Mai 2005. |
| *Achillea odorata* | Asteraceae | Bazoul | Le mois de Juillet 2005. |

**1.3. Hydrodistillation des huiles essentielles des quatre plantes :**

L'extraction des huiles essentielles des plantes sélectionnées a été effectuée par hydrodistillation à l'aide d'un appareil de type Clevenger (figure 15) dont le montage est composé de 4 parties principales :

- Le réacteur un ballon (de capacité d'un litre) dans lequel on introduit la matière végétale et l'eau.
- La colonne, un cylindre en verre placé au dessus du réacteur qui recueille la phase vapeur.
- Le réfrigérant dans lequel se condensent les vapeurs.
- Un décanteur où vont se séparer la phase organique (huile essentielle) et la phase aqueuse (eau florale).

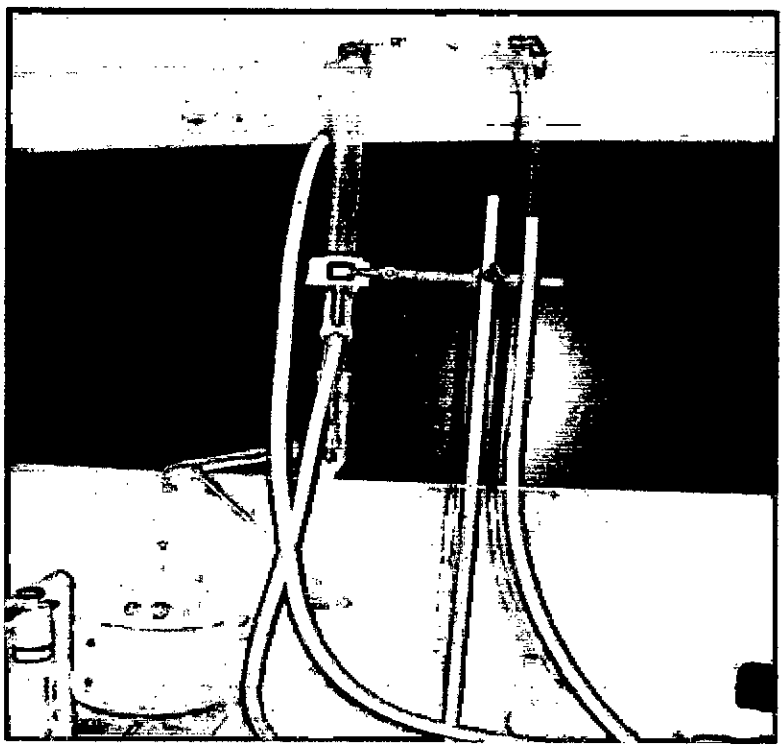


**Figure 15** : Appareil d'hydrodistillation (Clevenger).

Le principe de cette méthode est donc basé sur un entraînement des constituants volatils de l'huile essentielle par la vapeur d'eau. Cette dernière chargée de principes volatils est condensée dans un réfrigérant pour donner de l'huile essentielle après décantation.
Les conditions opératoires d'hydrodistillation des quatre spécimens sont présentées dans le tableau4.

**Tableau 4 :** Conditions opératoires d'hydrodistillation selon les plantes sélectionnées.

| Conditions | *Origanum vulgare* | *Mentha pulegium* | *Lavandula stoechas* | *Achillea odorata* |
|---|---|---|---|---|
| Partie utilisée | Partie aérienne | Partie aérienne | Feuilles | Partie aérienne |
| Quantité de matière végétale | 75 grammes | 75 grammes | 50 grammes | 50 grammes |
| Quantité d'eau | 2/3 du volume du ballon | 2/3 du volume du ballon | 2/3 du volume du ballon | 2/3 du volume du ballon |
| Température | 100° C | 100°C | 100°C | 100°C |
| Temps d'hydro-distillation | 4 h | 4 h | 4 h | 4 h |

Les huiles essentielles ainsi obtenues sont conservées à 4°C dans des tubes fermés, sous abri de la lumière jusqu'à leur usage.

**1.4. Analyse chimique des huiles essentielles :**

Les composants chimiques des huiles essentielles des quatre plantes sont identifiés par une analyse chromatographique en phase gazeuse (CPG), en utilisant un chromatographe de type Shimadzu QP 2010, couplée à la spectrométrie de masse (SM), en utilisant un spectrographe de masse de type Shimadzu QP 2010.
Ce couplage permet de déterminer simultanément le nombre de constituants de l'essence, leurs pourcentages respectifs et leurs ordres de sorties.
Les conditions expérimentales de cette analyse sont les suivantes : La température de la colonne 60°C (8 min) à 180°C (3°C/min), jusqu'à 230°C (20°C/min), mode d'injection, Split, Split ratio 1 :40, volume injecté de l'huile est 0.6 µl, le gaz vecteur est l'Hélium (122.2 Kpa).

## 2. Souches microbiennes :

### 2.1. Souches bactériennes :

#### 2.1.1. Origine :

Les souches bactériennes testées *in vitro* afin de mettre en évidence l'activité antibactérienne des quatre huiles essentielles nous ont été fournies par le laboratoire de Microbiologie de la faculté des Sciences, Université de Jijel. Il s'agit de :

Sept espèces appartenants au genre *Salmonella* (*S.virchow* (A1), *S.newport* (A2), *S.infantis* (A3)) *S.dublin* (A4), *S.senftemberg* (A5), *S. enteridis* (A6) et *S.panama* (A7)) et cinq souches *Escherichia coli*. Ces isolats Gram négatif ont été isolés à partir d'échantillons prélevés de différents organes de volailles. Les souches Gram positif fournies (quatre souches *Staphylococcus aureus* et cinq souches appartenants au genre *Streptococcus*) ont été isolées à partir de prélèvements des laits mammiteux issus de vaches atteintes de mammites.

**a. Le genre *Salmonella* :**

Le genre *Salmonella* ne comprend qu'une seule espèce selon les travaux récents de taxonomie, c'est l'espèce *Salmonella enterica* divisée en 7 sous espèces qui sont subdivisées sur la base de leurs antigènes O, H, et de capsule [74] .

Les salmonelles sont des parasites de l'homme, des mammifères (rongeurs), des oiseaux (volailles) et des animaux à sang froid (reptiles). Elles sont responsables de nombreuses infections dont les salmonelloses.

**b. Espèce *Escherichia coli* :**

*Escherichia coli* (*E.coli*) est une entérobactérie mobile capable de fermenter le lactose et de produire de l'indole. C'est une bactérie vivant couramment dans les intestins de l'homme et des animaux à sang chaud. Elle peut devenir pathogène si les défenses de l'hôte se trouvent affaiblies.

Chez les animaux, les *E.coli* son responsables de nombreux maladies dont la colibacillose, l'œdème intestinal, les mammites et la métrite.

**c. Espèce *Staphylococcus aureus* :**

*Staphylococcus aureus* de la famille des Micrococcacea, est un cocci à Gram positif qui tend à se grouper en amas, se cultive facilement sur les milieux usuels et aussi sur des milieux riches en Nacl. Elle possède une coagulase, ce qui la distingue de la plupart des autres espèces de staphylocoques [89].

*Staphylococcus aureus* ou staphylocoque doré est une espèce saprophyte présente sur le corps et les muqueuses, et souvent responsable d'infections graves communautaires et nosocomiales (20% des cas) [42,102]. Cette bactérie est responsable d'infections des plaies, de la peau et du sang [34]. Elle acquiert facilement des résistances aux antibiotiques et en particulier à la pénicilline, à la méthicilline et aux fluoroquinolones [54].
Chez les animaux *Staphylococcus aureus* est considérée comme étant parmi les germes causants les mammites [12] ainsi que l'impétigo de la mamelle.

**d. Le genre *Streptococcus* :**

Le genre *Streptococcus* appartient à la famille des Streptococcaceae, qui comprend sept genres dont *Streptococcus* et *Enterococcus* regroupent la plupart des espèces responsables d'infections humaines ou animales. Les bactéries appartenant au genre *Streptococcus* sont des cocci à Gram positif se disposant en chaînettes plus au moins longues.
Elles ont un métabolisme anaérobie, mais peuvent se cultiver en présence d'air. Leur culture nécessite habituellement des milieux riches [89].
Les streptocoques sont présents partout. Ils sont rencontrés dans l'environnement, ils vivent à l'état commensal au niveau des téguments et des muqueuses de l'homme et des animaux [19].
Les maladies dans lesquelles le streptocoque apparaît avoir une signification étiologique chez l'animal sont nombreuses, on peut citer : les infections mammaires dues à différentes souches.

**2.1.2. Conservation :**

La conservation des souches dans le réfrigérateur assure un minimum de changements morphogénétiques dues à des repiquages successifs qui garantissent leur stabilité dans le temps.

**2.1.3. Entretien :**

L'entretien des souches se fait sur le milieu Hektoen pour *E.coli* et les salmonelles, sur milieu Chapman pour les staphylocoques et la gélose au sang pour les streptocoques, par prélèvements des souches conservées et 2 repiquages successifs tous les 15 jours environ ou avant chaque nouvelle série de tests.

**2.1.4. Reidentification des souches :**

**2.1.4.1. Revivification des souches :**

A partir de chaque souche conservée sur gélose inclinée on prélève une oêse de culture, et on la dépose dans un tube contenant le bouillon au selinite acide de sodium et cystine (SFB) pour les *E.coli* et les salmonelles et le bouillon nutritif pour les staphylocoques et les streptocoques. On incube les tubes à 37°C pendant 24 heures.

**2.1.4.2. Isolement des colonies :**

L'isolement des colonies après 24 heures d'incubation des bouillons se fait sur différents milieux, Hekteon, Chapman et gélose au sang.

**2.1.4.3. Identification morphologique des souches :**

**- la coloration de Gram :**

Cette coloration aide à déterminer deux grands groupes appelés Gram positif et Gram négatif colorés respectivement en violet foncé et en rose. Elle nous permet aussi de connaître la morphologie et le mode de regroupement des bactéries.

Sur des lames dégraissées et à partir de chaque boite ou milieu d'isolement, on prépare les frottis bactériens : on prélève par l'anse de platine une colonie bactérienne et l'étaler sur une goutte d'eau physiologique déposée sur la lame, on laisse sécher à l'aire libre puis on fixe notre étalement par simple passage sur la flamme du bec benzen.

Les frottis bactériens ainsi préparés, sont ensuite successivement recouverts par les réactifs suivants :

- Le violet de gentiane pendant 1 minute.
- Le lugol pendant 1 minute.
- L'alcool pour la décoloration de l'étalement bactérien.
- La fushine pendant 30 secondes.

On lave, on sèche les lames entre 2 feuilles de papier absorbant et on passe à l'observation microscopique à l'objectif x100.

**2.1.4.4. Profil biochimique :**

**a- profil biochimique pour les salmonelles et *E. coli* :**

Ces tests reposent sur la recherche d'enzymes responsables de certaines réactions biochimiques, l'utilisation d'un substrat particulier ou la recherche de produits issus du métabolisme bactérien.

Parmi les tests d'identification des salmonelles et des *E.coli*, nous avons réalisé les tests biochimiques suivants :

**- Dégradation du Mannitol :**

Le mannitol est un produit de la réduction du D mannose. Le milieu Mannitol mobilité en culot permet de rechercher simultanément la fermentation du mannitol et la mobilité bactérienne. Ce milieu contient dans sa composition un indicateur de pH, le rouge de phénol qui est jaune à pH acide et rose à pH alcalin.

Nous avons ensemencé chaque tube de ce milieu par piqûre centrale à l'aide d'une anse de platine chargée à partir des boites d'isolement et incubé à 37 °C pendant 24 heures.

La mobilité bactérienne se traduit dans ce milieu par l'apparition d'un développement bactérien sous forme d'un nuage autour de la piqûre centrale.

**- Dégradation du lactose :**

Pour la recherche de la fermentation du lactose, nous avons utilisé le milieu Hektoen. Il contient environ 12 g de lactose et indicateur de pH, le bleu de bromothymol qui est jaune à pH acide.

Nous avons ensemencé les boites Petri qui contiennent le milieu Hektoen à l'aide d'anse de platine par stries transversales puis nous avons incubé les boites à 37°C pendant 24 heures.

**- dégradation du glucose, saccharose et lactose en milieu TSI :**

Le milieu TSI permet la mise en évidence de plusieurs caractères biochimiques en même temps ; la fermentation du glucose, saccharose et lactose, la production du sulfure d'hydrogène ($H_2S$) et la production de gaz. Ce milieu contient comme le milieu Mannitol mobilité le rouge de phénol comme indicateur de pH, et il est composé de deux parties, le culot et la pente.
Si la bactérie utilise le glucose, le culot se colore en jaune, et si elle utilise le saccharose et le lactose c'est la pente qui se colore en jaune. La production de gaz se traduit soit par la formation de bulles de gaz ou le décollement de la gélose, et la production d'$H_2S$ se traduit par un noircissement du milieu.

Nous avons ensemencé le milieu TSI à l'aide d'une anse stérile par piqûre centrale dans le culot et par des stries longitudinales au niveau de la pente, et nous avons incubé les tubes ensemencés à 37°C pendant 24 heures.

**- Recherche d'une uréase :**

L'uréase est une enzyme qui permet à la bactérie l'hydrolyse de l'urée en carbonate d'ammoniaque. L'ammoniaque produite alcalinise le milieu de culture.
La recherche de ce caractère est possible en milieu Urée indole, milieu liquide dont le virage de l'indicateur au rouge violacé signe l'utilisation de l'urée par la bactérie.

Nous avons ensemencé 1 ml du milieu Urée indole par l'anse de platine stérile et incubée à 37°C pendant 24 heures.

**- Recherche d'indole :**

L'indole est un produit de dégradation du tryptophane. Seules les bactéries dites indologènes permettent cette dégradation jusqu'à la formation d'indole.

Nous avons ensemencé 1 ml du milieu urée indole et incubé à 37°C pendant 24 heures.
Après l'incubation la présence d'indole dans le milieu est mise en évidence par la formation d'un anneau rouge sur la surface du milieu en présence du réactif Kovacs-Ehrlich.

**- La recherche de la lysine décarboxylase (LDC), ornithine décarboxylase (ODC) et l'arginine déshydrolase (ADH) :**

La lysine décarboxylase, l'ornithine décaboxylase et l'argénine déshydrolase catalysent la décarboxylation de la lysine, l'ornithine et l'argenine respectivement.
La mise en évidence de ces enzymes se fait dans le milieu Moeller enrichi par : la lysine, l'ornithine et l'argénine.

Nous avons ensemencé 1 ml de chaque milieu par le germe étudié et incubé à 37°C pendant 24 heures. La présence de ces enzymes se traduit par l'apparition de la couleur violette.

**- La recherche d'une citrate perméase :**

Le milieu citrate de Simmons permet de mettre en évidence la présence chez les bactéries à étudier une enzyme, citrate perméase qui permet l'utilisation du citrate comme source de carbone, et qui dégradé jusqu'au stade $CO_2$, aboutit à une alcalinisation du milieu. Le virage de couleur de vert (à pH acide) en bleu (à pH alcalin) dans le milieu peut être observé grâce à la présence dans la composition de ce dernier, de l'indicateur de pH, le bleu de bromothymol.

Nous avons ensemencé le milieu citrate de Simmons par des stries longitudinales de bas en haut et incubé à 37°C pendant 24 heures.

**- La recherche d'une nitrate réductase :**

La nitrate réductase est une enzyme qui permettra à la bactérie de réduire les nitrates ($NO_3$) en nitrite $NO_2$. Le bouillon nitrate est le milieu utilisé pour la mise en évidence de cette enzyme.

Nous avons ensemencé le bouillon nitrate par le germe étudié et incubé à 37°C pendant 24 heures.
Après l'incubation on ajoute 2 gouttes du réactif nitrate I (solution Naphtol à 6% dans l'alcool à 60 %) et 2 gouttes du réactif nitrate II.
-Si le milieu devient rose ou rouge: la réaction est nitrate réductase positive.
- Si le milieu reste incolore, ici on a deux éventualités :

- Ou bien les nitrates ont d'abord été réduits en nitrite mais la réduction s'est poursuivie.
- Ou bien les nitrates n'ont pas été réduits en nitrites et se trouvent donc dans le bouillon nitrate.

Dans ce dernier cas, on provoquera la réduction chimique par l'ajout de la poudre de zinc. Et si la couleur apparaîtra on dit que la bactérie est nitrate réductase négative.

**- Recherche de produits résultants de la fermentation du glucose :**

**- Réaction du rouge de méthyle (RM) :**

Cette réaction permet de différencier, parmi les entérobactéries, les forts producteurs d'acide ($RM^+$) des faibles producteurs ($RM^-$). Le milieu Clark et Lubs est le milieu utilisé pour mettre en évidence ce caractère.

Nous avons ensemencé ce milieu par l'anse de platine stérile à partir des boites d'isolement et incubé à 37°C pendant 24 heures.
Après 24 heures on ajoute 2 gouttes du réactif rouge de méthyle (qui est rouge à pH au dessous de 4,2 et jaune à pH au dessus de 6,3), et on note le changement de couleur.

**- Réaction de Vosges-Proskaur (VP) :**

La réaction VP permet la mise en évidence de la production d'acétyle-méthyle-carbinol ou acétoine. L'acétoine est un produit intermédiaire dans une fermentation butandiolique caractéristique de certaines entérobactéries dites (VP+).Vosges et Proskaur ont décrit une réaction simple permettant de déceler l'acétoine parmi les produits d'une fermentation. Dans un milieu bien aéré et fortement alcalinisé (par addition de NaOH), il se produit une autooxydation de butanediol en acétoine et en diacétyl.

$$CH_3\text{-}CHOH\text{-}CHOH\text{-}CH_3 \longrightarrow \underset{\text{Acétoine}}{CH_3\text{-}CO\text{-}CHOH\text{-}CH_3} \longrightarrow \underset{\text{Diacétyl}}{CH_3\text{-}CO\text{-}CO\text{-}CH_3}$$

Le diacétyl formé réagit avec le groupe Guanidine de l'argenine (présente dans les peptones) pour former un complexe coloré en rose.

Nous avons ensemencé le milieu Clark et Lubs et incubée à 37°C pendant 24 heures.
Après l'incubation on ajoute 0.5 ml d'α naphtol et 1 ml de la solution potasse à 16%, agiter et maintenir le tube couché pour favoriser l'oxydation. S'il y'a apparition de la couleur rose la réaction est VP positive.

**- Recherche d'une catalase :**

La catalase est une enzyme ayant la propriété de décomposer l'eau oxygénée avec dégagement d'oxygène. C'est l'action directe de l'enzyme qui est mise en évidence dans la masse bactérienne [72].

Sur une lame, nous avons déposé une goutte d'eau oxygénée ($H_2O_2$) et nous avons ajouté une anse de culture à étudier. S'il y'a un dégagement gazeux ($O_2$), le test est positif.

**b- Profil biochimique pour les *Staphylococcus aureus:***

Les tests qu'on a pu réalisé pour les staphylocoques sont :

**- La recherche d'une catalase :**

La recherche d'une catalase est un test important pour différencier les staphylocoques des streptocoques. La réalisation de ce test a été effectuée de la même manière comme pour les *E.coli* et les salmonelles.

**- Dégradation du mannitol :**

Nous avons ensemencé chaque tube du milieu mannitol par piqûre centrale à partir du milieu d'isolement, le milieu Chapman.

**- Recherche d'une staphylocoagulase :**

La recherche de la staphylocoagulase a pour but de déterminer la pathogénécité d'un staphylocoque. Les staphylocoques pathogènes secrètent une enzyme, la staphylocoagulase qui a la propriété de coaguler le plasma.

Nous avons prélevé une colonie ayant fermentée le mannitol de chaque milieu Chapman et la mettre dans 0.5 ml du bouillon nutritif et incubé à 37°C pendant 24 heures. Après 24 heures d'incubation nous avons ajouté 0.5 ml du plasma et incubé à 37°C et nous avons examiné les tubes toutes les ½ heures pendant 6 heures. Le test positif se traduit par la formation d'un coagulum au fond des tubes.

**c - Profil biochimique des streptocoques :**

**- recherche de la catalase :**

La mise en évidence de se caractère se fait de la même manière que pour les cas précédents.

## 2.2. Souche fongique :

La souche fongique *Microsporun spp* testée a été isolée à partir d'animaux atteints de teignes. Le genre *Microsporum* est un ascomycète appartenant à la famille des Arthrodermataceae de l'ordre des Onygénales. C est l'un des genres impliqués dans les dermatophytoses.

Les dermatophyties ou « teignes » sont des infections causées par des fongi kératophiles et kératolytiques. Les dermatophytes ont donc la particularité d'envahir et de proliférer dans les tissus kératinisés tels la couche cornée de l'épiderme, les poils, les ongles et les griffes.
Le genre *Microsporum*, *Trichophyton* et *Epidermophyton* sont les agents responsables de la majorité des dermatophyties d'origine animale.

### 2.2.1. Prélèvement :

Nous avons réalisé plusieurs prélèvements de poils de différents animaux pour au moins avoir une culture positive.
Les poils sont prélevés à l'aide de pinces, on a préféré les poiles abîmés, ou ceux qui sont à la périphérie des lésions. Nous avons réalisé aussi des raclages qui nous en permis de recueillir des débris pilaires et des squames.
Tous les prélèvements effectués ont été placés dans des tubes à essais en verre stérile et acheminés vers le laboratoire de Microbiologie de la faculté des Sciences.

### 2.2.2. La culture :

Seul la culture permet l'identification exacte du champignon.
Nous avons ensemencé les prélèvements sur la gélose Sabouraud, chaque poil était ensemencé au milieu de la boite Petri. On laisse par la suite les cultures à température ambiante entre 6 à 15 jours.

### 2.2.3. Identification :

Après la culture, la détermination de la souche fongique isolée repose sur l'observation de :
- L'aspect macroscopique : en se basant sur la description du recto de la culture, l'aspect, la couleur d'une part, et la description du verso de la culture d'une autre part.
- La rapidité du développement de la culture.
- L'aspect microscopique : l'identification microscopique doit obligatoirement être effectuée.

Pour cela, nous avons prélevé un fragment de la culture mycélienne par une pince stérile puis le fragment est placé sur une lame dans une goutte d'eau physiologique, on le recouvre par une lamelle et il est examiné sous microscope.
Au microscope l'aspect du thalle, la forme des organes de fructifications aide à identifier le dermatophyte. Nous avons eu recours à un mycologiste pour l'identification exacte du dermatophyte.

## 3. Etude de l'activité antimicrobienne des quatre huiles essentielles :

### 3.1. Méthode de diffusion en puits :

Cette méthode repose sur le pouvoir migratoire des huiles essentielles à l'intérieur d'une boite de Petri dans un milieu nutritif solide. Cette technique a été appliquée par plusieurs auteurs [43, 85, 88], nous y avons apporté quelques modifications issues de notre pratique expérimentale.

#### 3.1.1 Tests antibactériens

**a- Préparation des inoculums (suspensions bactériennes) :**

Chaque suspension bactérienne était préparée dans un tube de 9 ml d'eau physiologique à 0,9%, par dilution d'une petite quantité de bactéries de la souche concernée, repiquée à partir d'une culture pure fraîche. L'opacité de la suspension doit être équivalente à 0.5 Mc Ferland, pour cela la concentration bactérienne des différentes solutions ou inoculums est évaluée par turbidité et est exprimée par la mesure de la densité optique (DO de 0.08 à 0.10 à 625 nm) sur un spectrophotomètre (Shimadzu mini UV 1240).
Pour les staphylocoques et les streptocoques nous avons effectué des ajustements pour la préparation des inoculums afin d'obtenir des colonies confluentes suffisamment denses.

**b- Procédure :**

Le milieu Muller Hinton [39] est le milieu utilisé pour tester la sensibilité des bactéries envers les huiles essentielles.
Le milieu de culture en surfusion est coulé dans des boites de Petri de 90 mm de diamètre sur une épaisseur de 4 mm. Après solidification l'ensemencement de chaque inoculum est réalisé en frottant

la surface du milieu à l'aide d'écouvillons stériles trempés dans les suspensions bactériennes. La totalité de la surface gélosée doit être ensemencée de bas en haut, en stries serrées, nous avons répété l'opération 3 fois en tournant la boite de 60° à chaque fois.
Quatre puits de 6 millimètre de diamètre ont été perforés dans chaque boite ensemencée et soudés à leurs bases. Ces puits sont remplis de 20 µl de l'huile essentielle à tester. Les boites de Petri sont en suite fermées et mises à l'étuve à 37°C pendant 24 heures.
A la sortie de l'étuve, l'absence de la croissance bactérienne se traduit par un halo translucide (zone d'inhibition) autour de chaque puits, identique à de la gélose stérile, dont le diamètre est mesuré et exprimé soit en cm, soit en mm.

**c- Quantité minimale inhibitrice :**

En bactériologie médicale, chaque souche est caractérisée par deux valeurs : Le diamètre d'inhibition et la concentration minimale inhibitrice (CMI), établie selon la méthode de référence par dilution en milieu gélosé. La CMI est la plus petite concentration d'antibiotique capable d'inhiber la croissance bactérienne à l'œil nu [75].

Après avoir réalisé le screening antibactérien, nous avons choisi de déterminer la quantité minimale inhibitrice pour l'huile essentielle la plus active et dont la sensibilité envers toutes les souches était positive.

La préparation des inoculums, du milieu de culture Muller Hinton et l'ensemencement des boites coulées se font de la même manière comme pour la réalisation du screening antibactérien.
L'huile essentielle a été solubilisée dans l'huile de paraffine et le volume déposé dans chaque puits était 20 µl pour des dilutions 50%, 20%, 10%, 5%, 4%, 3.33%. Dans chaque boite on a confectionné sept puits, dont 6 étaient remplis par les dilutions préparées et le 7 $^{éme}$ , le puits central était remplis de 20 µl de l'huile de paraffine. Les boites sont ensuite mises à l'étuve à 37°C pendant 24 heures.
A la sortie de l'étuve, la quantité minimale inhibitrice correspond à la dilution pour laquelle la zone ou halo d'inhibition ne s'est par formée.

**3.1.2 Tests antifongiques :**

Après l'isolement du dermatophyte, une suspension fongique était préparée dans 9 ml d'eau physiologique à 0.9 %.
La gélose de Sabouraud est le milieu utilisé pour l'évaluation de l'activité antifongique des quatre huiles essentielles.

La gélose Sabouraud est fondue au bain-marie puis coulée dans des boite de Petri de 90mm de diamètre sur une épaisseur de 4 mm. Une boite est utilisée pour chaque huile pour le même dermatophyte.

Après solidification de la gélose, le dermatohpyte est cultivé sur le milieu Sabouraud :

- Par des stries serrées sur toute la surface à partir de la suspension fongique à l'aide d'écouvillon stérile.
- Avec 3 fragments découpés dans un tapis mycélien de préculture, et déposés autour d'un puits central de 6 millimètres de diamètre perforé et soudé à sa base dont il est rempli de 20 µl de l'huile essentielle à tester.

Les boites Petri sont ensuite fermées et laissées à température ambiante pendant 6 à 15 jours.

La boite témoin est une boite Petri ensemencée dans les conditions de l'expérience, sans confection du puits et donc sans l'ajout de l'huile essentielle. Elle nous renseigne sur l'homogénéité et la croissance du tapis mycélien.

### 3.2. Méthode des microatmosphères ou méthode en phase vapeur :

Nous avons appliqué cette méthode (figure16) seulement pour l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* avec l'utilisation de cinq souches bactériennes. Notre but était d'essayer d'exploiter les propriétés antibactériennes de la phase volatile de l'huile essentielle. Cette méthode est techniquement proche de celle de diffusion en puits, sauf que l'huile essentielle ne sera pas en contact direct avec le milieu gélosé. Elle est rarement citée car les autres qui se sont penchés spécifiquement sur l'activité de la phase gazeuse sont encore peu nombreux [33,36, 110].

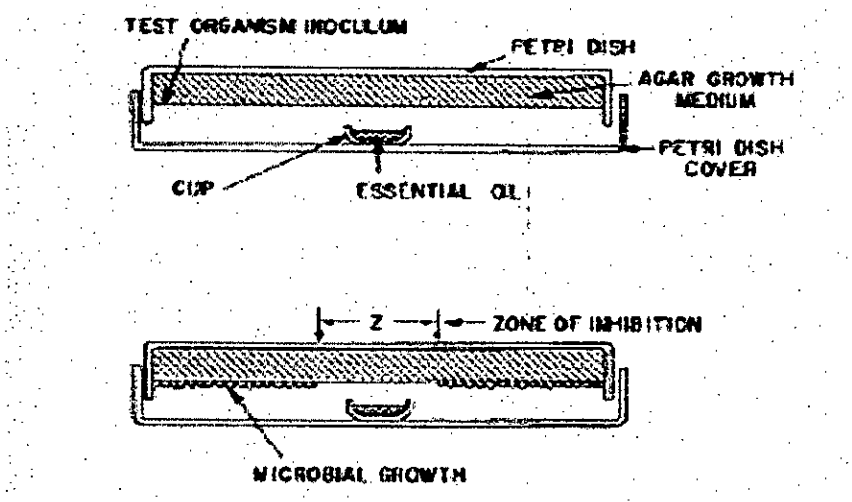



**Figure 16 :** Méthode des microatmosphères.

### 3.2.1 Tests antibactériens :

**a- Préparation des disques :**

Nous avons utilisé le papier Wattman numéro 3, coupé en disques de 10 mm de diamètre. Ils doivent avoir un contour régulier pour donner une zone d'inhibition facile à mesurer. Les disques une fois préparés, sont placés dans un tube à essais contenant 10 ml d'eau distillée, puis autoclavés pendant 20 minutes à 120°C pour procéder à leurs stérilisations.

**b- Préparation des inoculums :**

Les suspensions bactériennes des cinq souches (*Staphylococcus aureus* $C_2$ , *Staphylococcus aureus* $C_5$ , *E.coli* $B_4$ , *Salmonella* $A_3$ et *Salmonella* $A_2$) étaient préparées dans des tubes contenant 9 ml d'eau physiologique à 0.9 % à partir de cultures fraîches. L'opacité des inoculums est évaluée par turbidité et est exprimée par la mesure de la densité optique.

**c- Procédure :**

Le milieu Muller Hinton en surfusion est coulé dans des boites de 90 mm de diamètre, sur une épaisseur de 4 mm. Après solidification, les boites sont préséchées 30 minutes à l'étuve puis ensemencées à partir de chaque inoculum à l'aide d'écouvillons stériles.
Un disque imbibé de 20 µl de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* est déposé au milieu du couvercle de chaque boite de Petri et non plus en contact directe avec les géloses ensemencées. Les boites sont fermées avec le couvercle en bas et mises à l'étuve à 37°C pendant 24 heures.
L'absence de la croissance bactérienne se traduit par une zone translucide sur la gélose de contour plus au moins nette, à tendance circulaire lorsque le disque est bien centré. Les résultats se traduisent par la mesure des diamètres des zones translucides (zones d'inhibition) en mm ou en cm.

### 4. Evaluation de l'effet scavenger (Methode au DPPH°):

L'effet scavenger ou la capacité de piégeage des radicaux libres des quatre huiles essentielles à tester est déterminé *in vitro* par le test du DPPH° (1, 1-diphenyl-2-pycril-hydrazyl).
Le test DPPH° est largement utilisé pour tester la capacité des composés d'agir entant qu'éboueurs des radicaux libres ou donneurs d'hydrogène [27, 122].

En présence de composés antiradicalaires ou antioxydants, Le DPPH° sous sa forme oxydée sera réduit (figure17) en passant du violet au jaune, ce changement de couleur se traduit par une décroissance de l'absorbance en fonction du temps à 517nm.

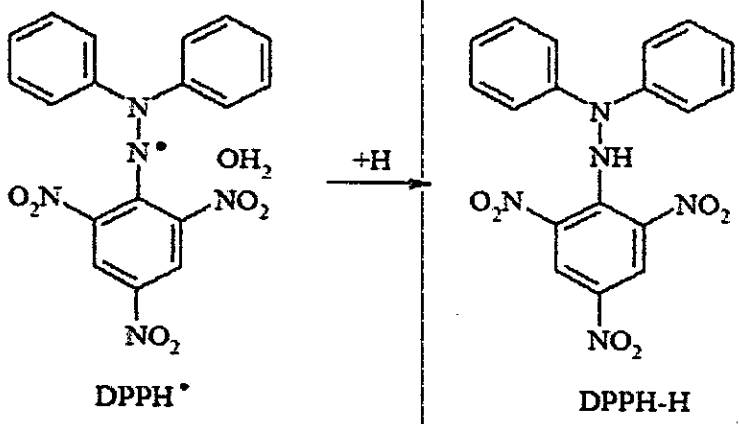



**Figure 17 :** Forme radicalaire et réduite du DPPH°.

En effet dans une cuve en quartz de 3 ml, 1,5 ml d'une solution ethanolique du DPPH (100 uM) sont mélangés avec 15 µl de l'huile essentielle pure à tester. La densité optique du mélange réactionnel est lue dans un spectrophotomètre (Shimadzu mini uv 1240) pendant 5 minutes chaque 15 secondes sur une longueur d'onde 517 nm. On a utilisé la Quercitine (figure18), un antioxydant puissant, comme témoin de l'expérience.

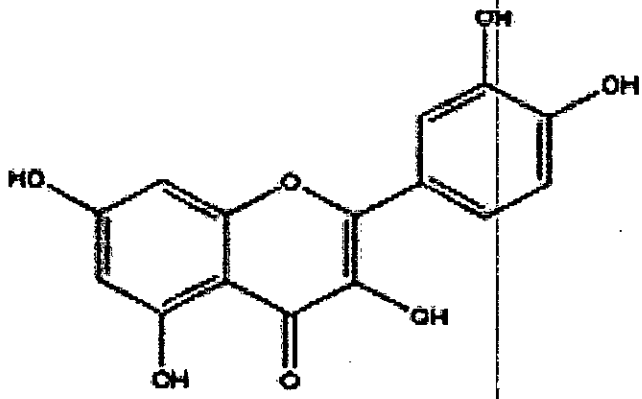



**Figure 18 :** Structure chimique de la quercitine.

L'effet piégeur est déterminé en pourcentage de réduction selon la relation suivante :

$$\% \text{ de réduction} = [DO_C - DO_M / DO_C] \times 100.$$

$DO_C$ : densité optique de la solution ethanolique du DPPH après 5 min.

$DO_M$ : densité optique du mélange réactionnel après 5 min.

# Résultats

# II. Résultats :

## 1. Hydrodistillation :

Les quatre plantes : *Origanum vulgare*, *Achillea odorata*, *Lavandula stoechas* et *Mentha pulegium* ont été sélectionnées sur la base de leurs utilisations en médecine traditionnelle.

L'hydrodistillation est réalisée sur les plantes, placées dans un Clevenger avec un apport d'eau. L'extraction est conduite pendant quatre heures, durée de temps nécessaire à l'épuisement de la matière première (environ 90%) en huile essentielle dans les conditions opératoires décrites dans le tableau 4.

Les huiles essentielles obtenues possèdent des couleurs différentes leurs odeurs étaient agréables.

**Tableau 5 :** Durée d'extraction, rendement et couleur des huiles essentielles obtenues

| Plantes | *Origanum vulgare* | *Achillea odorata* | *Lavandula stoechas* | *Mentha pulegium* |
|---|---|---|---|---|
| Durée d'extraction | 4 h | 4 h | 4 h | 4 h |
| Couleur de l'huile essentielle obtenue | Jaune claire | Verte | Jaune | Blanche |
| Volume obtenu | 1.5 ml | 0.03 ml | 0.05 ml | 1 ml |
| Rendement | 2% | 0.06% | 0.1% | 1.33% |

## 2. Analyse chimique :

La composition chimique des trois huiles essentielles de *Lavandula stoechas*, *Mentha pulegium* et *Origanum vulgare* a été étudiée [32,47, 79, 111].

### 2.1. Profil chromatographique de l'huile essentielle d'*Achillea odorata* :

L'huile essentielle d'*Achillea odorata* est caractérisée par sa richesse en 1,8 cinéole. C'est le constituant majoritaire (23,35%). Notre huile renferme aussi d'autres composants tel que l'alpha terpinéol qui représente 10,16% (figure 19, tableau 6).

### 2.2. Profil chromatographique de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* :

L'huile essentielle de cette plante est caractérisée par sa dominance en thymol (25,30%) accompagné d'autres constituants comme le gamma terpinène qui représente 16,79% (figure20, tableau 6).

### 2.3. Profil chromatographique de l'huile essentielle de *Lavandula stoechas* :

Le profil chromatographique de l'huile essentielle de *Lavandula stoechas* montre une diversité en composition avec 30 composants détectés. L'huile de notre plante est dominée par le fenchone (50,93%) (figure 21, tableau 6).

### 2.4. Profil chromatographique de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* :

L'analyse de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* montre que la pulégone est le constituant majoritaire (75,42%). Cette huile peut être considérée comme une huile mono moléculaire car elle est constituée presque exclusivement d'une molécule majoritaire (figure 22, tableau 6).

**Tableau 6 :** Quelques composants des quatre huiles essentielles déterminés par CPG/ SM

| Huiles essentielles | Quelques composants |
|---|---|
| *Achillea odorata* | 1.8 cinéole (23.35%). |
| | alpha terpinéol (10.16%). |
| *Origanum vulgare* | Thymol (25.30%). |
| | Gamma terpinène (16.79%). |
| *Lavandula stoechas* | Fenchone (50.93%). |
| *Mentha pulegium* | Pulégone (75.42%). |

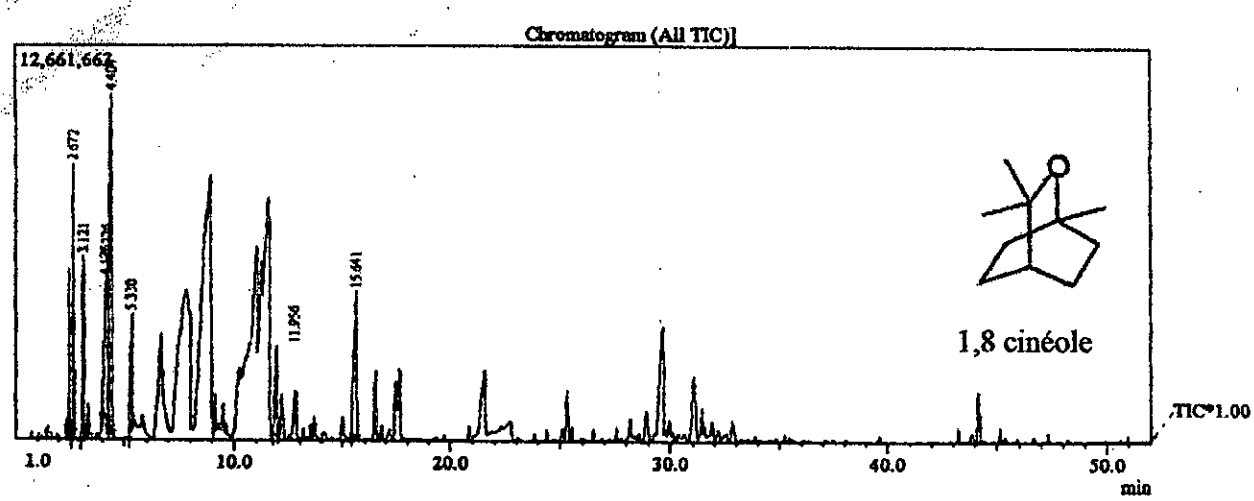



**Figure 19:** Chromatogramme des composants de l'huile essentielle d'*Achillea odorata*.

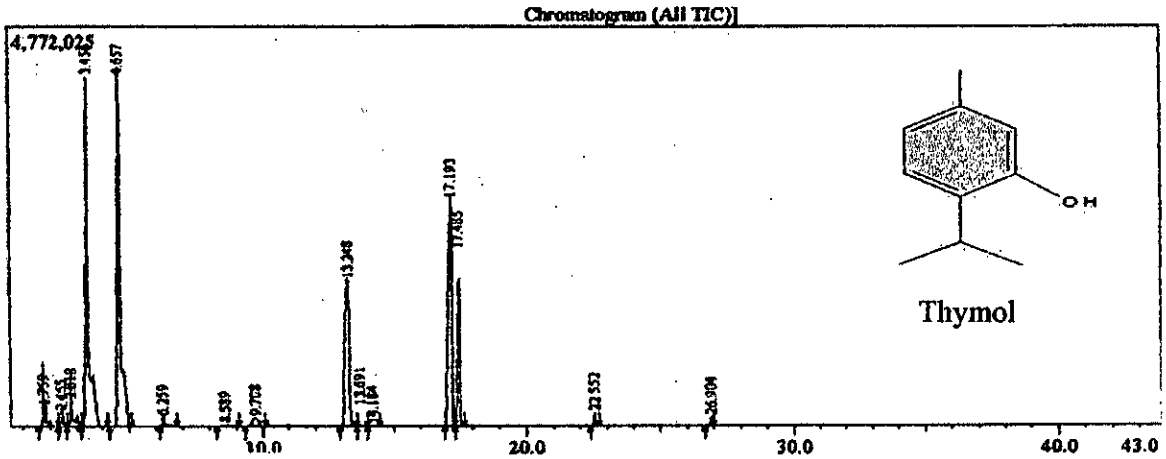



**Figure 20 :** Chromatogramme des composants de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare*.

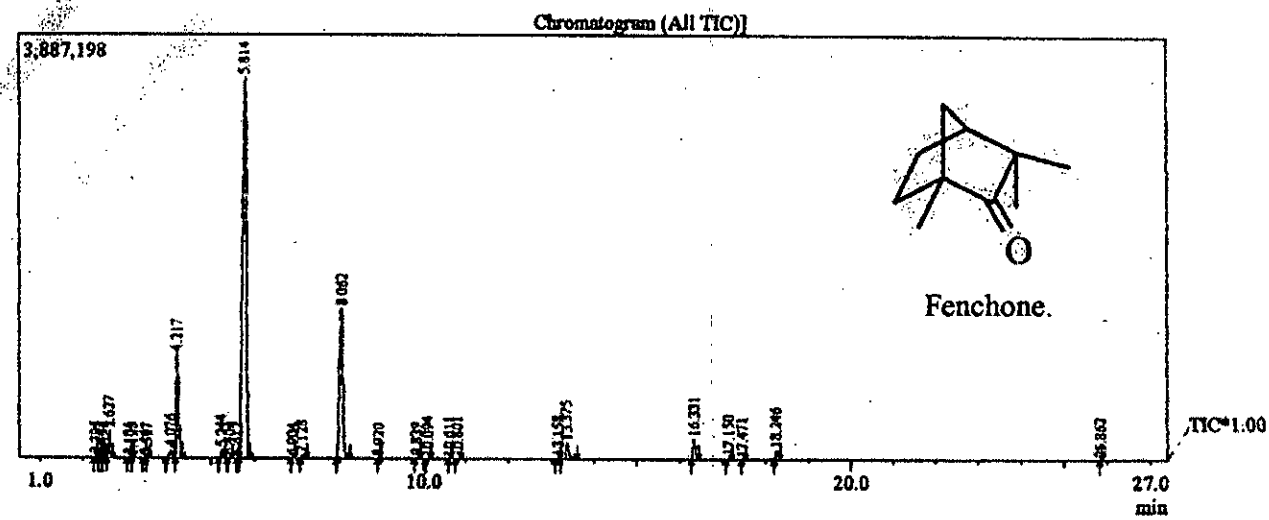



**Figure 21 :** Chromatogramme des composants de l'huile essentielle de *Lavandula stoechas*.

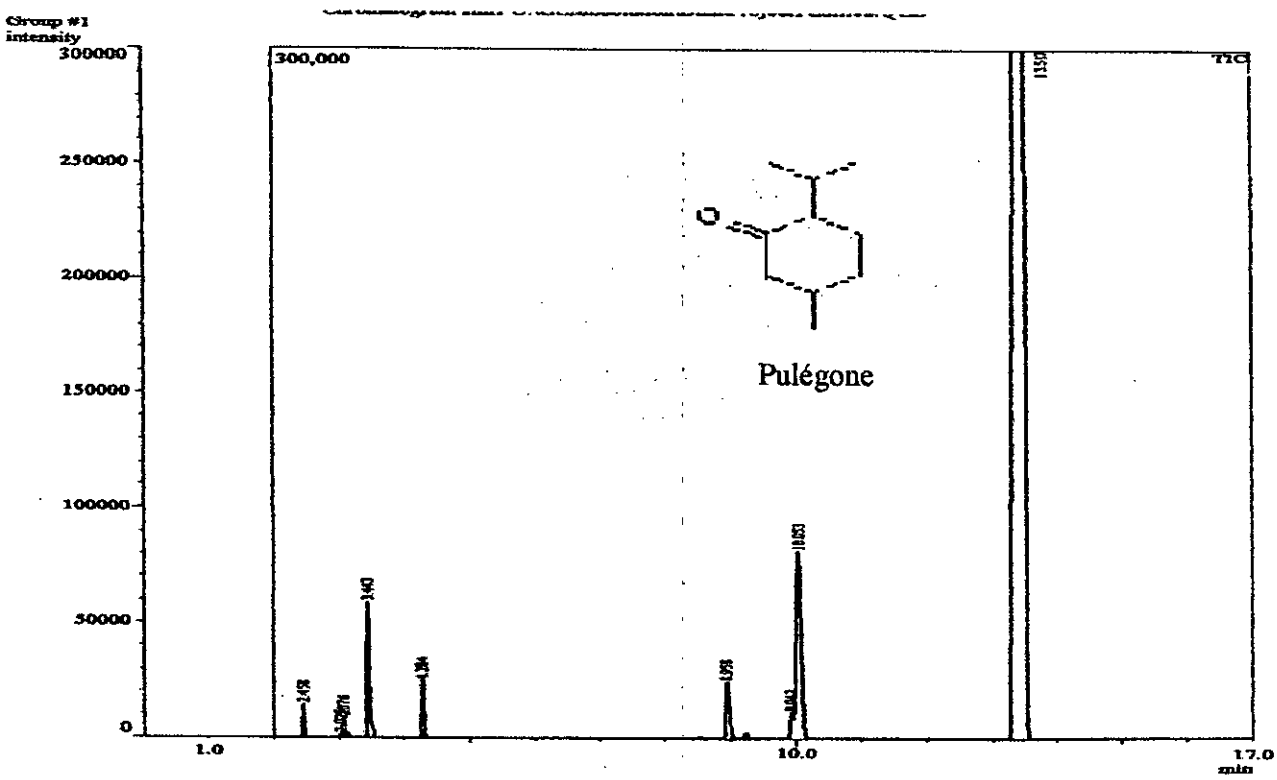



**Figure 22 :** Chromatogramme des composants de l'huile essentielle de *Mentha pulegium*.

## 3. Résultats de l'identification des souches bactériennes :

### 3.1. Isolement des souches :

L'isolement des souches après revivification, nous permet d'apprécier les caractères des colonies sur chaque milieu d'isolement et de s'assurer que nos souches ne sont pas contaminées.
Les souches *E.coli* sur milieu Hektoene donnent des colonies petites, brillantes, de couleur jaune.
Les salmonelles apparaissent sous forme de colonies de taille petite, de couleur bleu vert.
Les colonies de staphylocoques sur milieu Chapman étaient petites, lisses et pigmentées en jaune.
Les streptocoques sur la gélose au sang donnent des colonies petites, à borts réguliers. Les figures 23, 24, 25 et 26 donnent respectivement les résultats d'isolement des *E.coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus*.

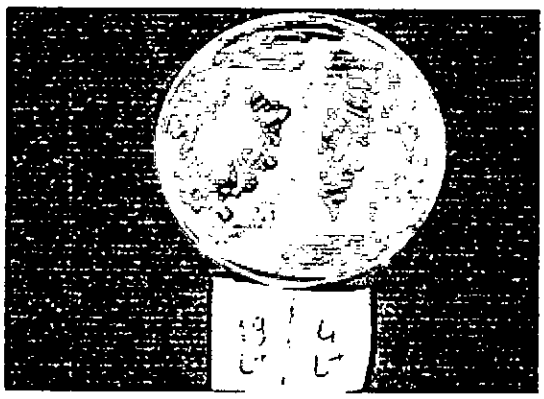


**Figure 23 :** souches *E.coli.*

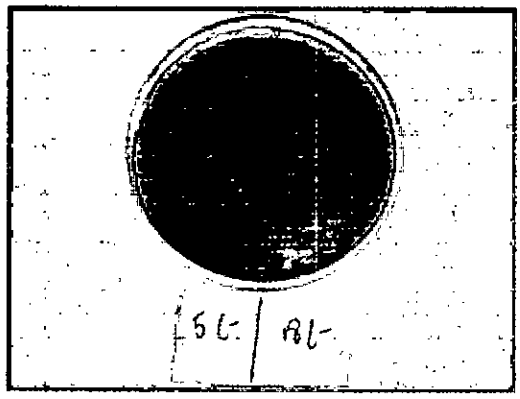


**Figure 24 :** souches *Salmonella.*

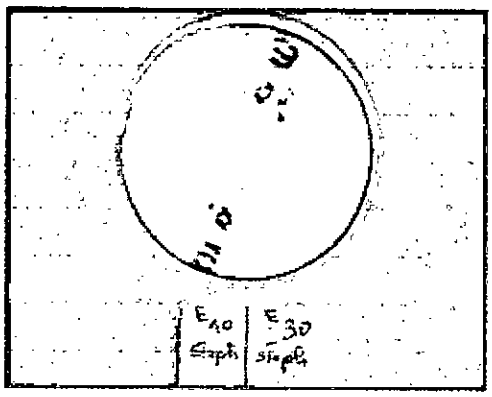


**Figure 25** : souches *Staphylococcus aureus*

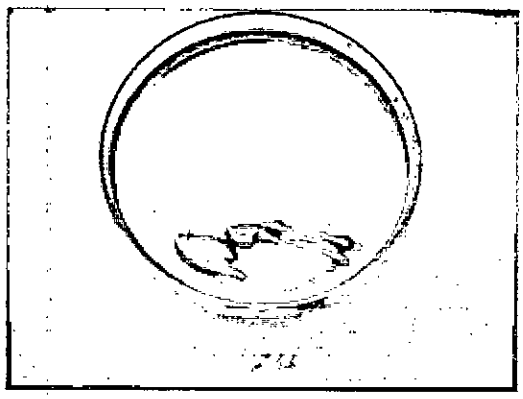
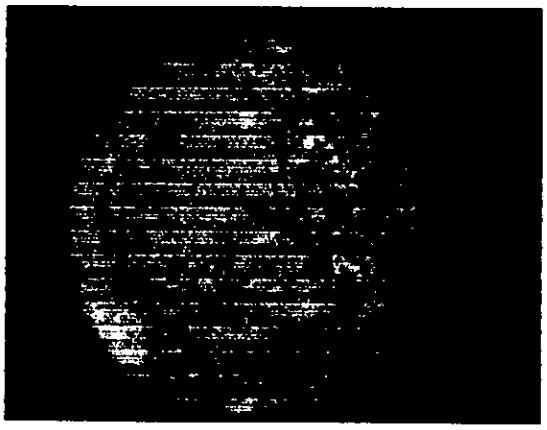


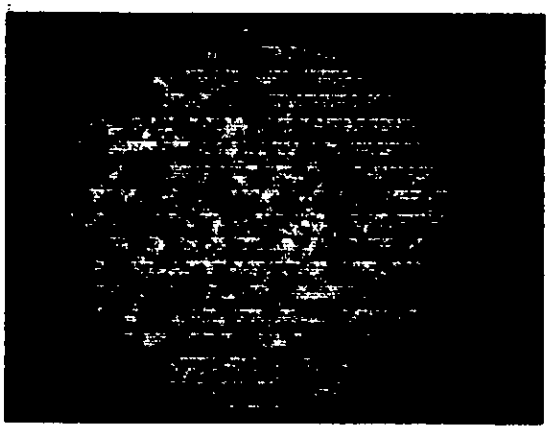
**Figure 26:** Souche *Streptococcus.*

### 3.2. Coloration de Gram :

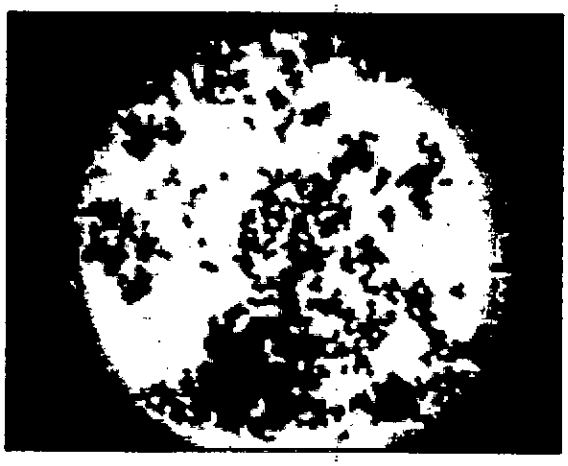
Les résultats de la coloration de Gram sont illustrés dans la figure 27.



Souche *E Coli*



Souche ***Salmonella***



Souche ***Staphylococcus aureus***

**Figure 27 :** La coloration de Gram des souches

Les souches *E.coli* et les souches salmonelles ont toutes une morphologie bacillaire, colorées en rose (Gram négatif).

Les staphylocoques se présentent sous forme de cocci coloré en violet (Gram positif). Ils sont groupés en amas ou grappe de raisin.

Les streptocoques sont également colorés en violet (Gram positif). Ils sont constitués de cellules en forme de cocci disposés en chaînettes, ou en diplocoques.

### 3.3. Profil biochimique :

#### a- Profil biochimique pour les salmonelles et des souches *E.coli* :

Les résultats de différents testes biochimiques réalisés pour les souches salmonelles et *E.coli* sont présentés dans le tableau 7.

Les salmonelles et les *E.coli* possèdent certains caractères en commun parce que ces 2 genres appartiennent à la même famille : celle des Enterobacteriaceae.

Au sein du même genre tel le cas du genre Salmonella. Certaines souches possèdent un ou deux caractères qui diffèrent.

#### b- Profil biochmique pour les Staphylococcus aureus et les Streptococcus :

Les résultats des testes biochimiques effectués pour les *Staphylococcus aureus* et les *streptococcus* sont regroupés dans le tableau 7.

Le test de la recherche d'une catalase est un test qui permet la différenciation entre les 2 genres : *Staphylococcus* et *streptococcus*.

**Tableau 7 :** Identification biochimique des souches testées

| Souche | Catalase | Lactose | Glucose | Saccha | $H_2S$ | Gaz | Citrate | Nitrate | Mannitol | Mobilité | VP | RM | Urée | Indole | LDC | ODC | ADH | coagulase |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *Ecoli B5* | + | + | + | + | - | + | - | + | + | + | - | + | - | + | + | + | + | |
| *E.coli B4* | + | + | + | + | - | + | - | + | + | + | - | + | - | + | + | + | + | |
| *E.coli B2* | + | + | + | + | - | + | - | + | + | + | - | + | - | + | + | + | + | |
| *E.coli B3* | + | + | + | + | - | + | - | + | + | + | - | + | - | + | + | + | + | |
| *E.coli B1* | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | - | + | - | + | + | + | + | |
| *Salmonella A3* | + | - | + | - | + | + | + | + | + | + | - | + | - | - | + | + | - | |
| *Salmonella A1* | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | - | - | + | + | - | |
| *Salmonella A5* | + | - | + | - | + | + | - | + | + | + | - | + | - | - | + | + | - | |
| *Salmonella A2* | + | - | + | - | + | + | + | + | + | + | - | + | - | - | + | + | - | |
| *Salmonella A6* | + | - | + | - | + | + | + | + | + | + | - | + | - | - | + | + | - | |
| *Salmonella A4* | + | - | + | - | + | + | + | + | + | + | - | + | - | - | + | + | + | |
| *Salmonella A7* | + | - | + | - | + | + | + | + | + | + | - | + | - | - | + | + | + | |
| *Staphylococcus aureusC1* | + | | | | | | | | + | | | | | | | | | + |
| *Staphylococcus aureusC2* | + | | | | | | | | + | | | | | | | | | + |
| *Staphylococcus aureusC3* | + | | | | | | | | + | | | | | | | | | + |
| *Staphylococcus aureusC4* | + | | | | | | | | + | | | | | | | | | + |
| *StreptococcusD1* | - | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| *StreptococcusD2* | - | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| *StreptococcusD3* | - | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| *StreptococcusD4* | - | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| *StreptococcusD5* | - | | | | | | | | | | | | | | | | | |

**4. Résultats de l'identification du dermatophyte :**

La culture du champignon est obtenue en 6 jours à température ambiante sur milieu Sabouraud. Les colonies étaient plates, blanche au départ, formant des prolongements étoilés (figure28), au verso pas de pigment particulier. L'examen microscopique sur lame révèle la présence de macroconidies à paroi épaisse à surface échinulée.

En comparaison avec les données bibliographiques et l'aide d'un mycologiste M. Bouldjedri de la faculté des Sciences, nous avons pu conclure que notre dermatophyte appartient au genre *Microsporum*.

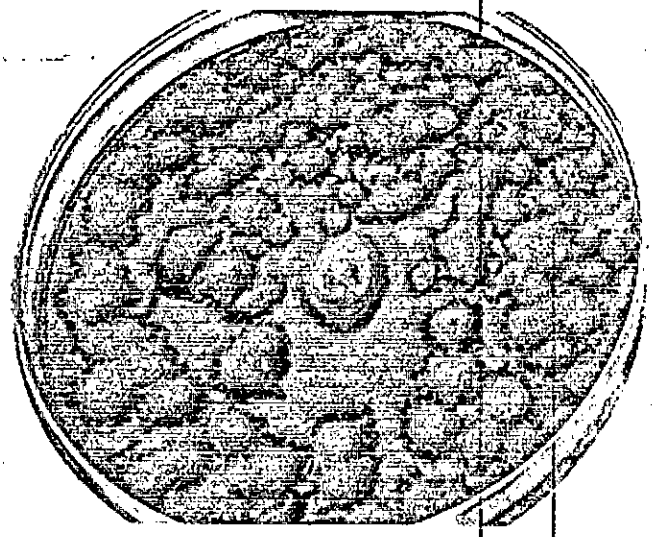


**Figure 28 :** La culture du dermatophyte

**5. Résultats de l'activité antimicrobienne des quatre huiles essentielles :**

**5.1. Méthode de diffusion en puits :**

**5.1.1. Résultats des tests antibactériens :**

Dans la littérature relative aux huiles essentielles, les résultats des aromatogrammes sont exprimés exclusivement à partir de la mesure du diamètre des halos d'inhibition, en cm ou en mm [35,37, 40, 66,76,115,117].

Cette mesure est souvent transcrite dans différents symboles proportionnels à l'activité 0, ± , +,+ +, + + + (tableau 8).

**Tableau 8 :** Transcription des valeurs des diamètres d'inhibition pour 10 µl d'huiles essentielles [8].

| Inhibition | Transcription | Sensibilité |
|---|---|---|
| 0 | 0 | Résistant |
| 0.5 cm | ± | Peu sensible |
| 1 cm | + | Sensible |
| 2 à 3 cm | + + | Assez sensible |
| > 3 cm | + + + | Très sensible |

**a- Action de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* :**

En milieu solide, comme nous l'avons déjà mentionné ci dessus, l'action de l'huile essentielle se traduit donc par l'apparition de zones d'inhibition autour des puits.

Le diamètre de ces dernières diffère d'une souche à une autre et va de 20 mm à 37 mm pour les bactéries Gram négatif et de 25 mm à 40 mm pour les bactéries Gram positif. L'huile essentielle testée était active sur l'ensemble des souches.

Les résultats des diamètres des zones d'inhibition sont regroupés dans tableau 9 et 10.

**Tableau 9 :** Diamètres des zones d'inhibition de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* vis à vis des souches Gram négatif.

| Souches bactériennes | Diamètres des zones d'inhibition en mm |
|---|---|
| *Salmonella* A1 | 35 mm |
| *Salmonella* A2 | 25 mm |
| *Salmonella* A3 | 30 mm |
| *Salmonella* A4 | 26 mm |
| *Salmonella* A5 | 28 mm |
| *Salmonella* A6 | 22 mm |
| *Salmonella* A7 | 20 mm |
| *E. coli* B1 | 23 mm |
| *E. coli* B2 | 27 mm |
| E. coli B3 | 20 mm |
| *E. coli* B4 | 37 mm |
| *E. coli* B5 | 26 mm |

**Tableau 10 :** Diamètres des zones d'inhibition de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* vis à vis des souches Gram positif.

| Souches bactériennes | Diamètres des zones d'inhibition en mm |
|---|---|
| *Staphylococcus aureus* C1 | 40 mm |
| *Staphylococcus aureus* C2 | 38 mm |
| *Staphylococcus aureus* C3 | 35 mm |
| *Staphylococcus aureus* C4 | 45 mm |
| *Streptococcus* D1 | 35 mm |
| *Streptococcus* D2 | 25 mm |
| *Streptococcus* D3 | 36 mm |
| *Streptococcus* D4 | 40 mm |
| *Streptococcus* D5 | 36 mm |

**b- Action de l'huile essentielle d'*Achillea odorata* :**

Les diamètres des zones d'inhibition de l'huile essentielle d' *Achillea odorata* sont groupés dans les tableaux 11 et 12.

**Tableau 11 :** Diamètres des zones d'inhibition pour l'huile essentielle d'*Achillea odorata* vis à vis des souches Gram négatif.

| Souches bactériennes | Diamètres des zones d'inhibition |
|---|---|
| *Salmonella* A1 | 18 mm |
| *Salmonella* A2 | 13 mm |
| *Salmonella* A3 | 18 mm |
| *Salmonella* A4 | 15 mm |
| *Salmonella* A5 | 14 mm |
| *Salmonella* A6 | 17 mm |
| *Salmonella* A7 | 16 mm |
| *E. Coli* B1 | 15 mm |
| *E. Coli* B2 | 17 mm |
| *E. Coli* B3 | 15 mm |
| *E. Coli* B4 | 22 mm |
| *E. Coli* B5 | 17 mm |

**Tableau 12:** Diamètres des zones d'inhibition pour l'huile essentielle d'*Achillea odorata* vis à vis des souches Gram positif.

| Souches bactériennes | Diamètres des zones d'inhibition |
|---|---|
| *Staphylococcus aureus* C1 | 38 mm |
| *Staphylococcus aureus* C2 | 35 mm |
| *Staphylococcus aureus* C3 | 28 mm |
| *Staphylococcus aureus* C4 | 20 mm |
| *Streptococcus* D1 | 27 mm |
| *Streptococcus* D2 | 18 mm |
| *Streptococcus* D3 | 0 mm |
| *Streptococcus* D4 | 12 mm |
| *Streptococcus* D5 | 22 mm |

Ces diamètres des zones d'inhibition de l'huile essentielle d'*Achillea odorata* varient entre 13 mm et 22 m pour les bactéries Gram négatif et entre 12 et 38 mm pour les bactéries Gram positif. Toutes les souches bactériennes étaient sensibles en vers cette huile mais à de moindres degrés en comparaison avec les diamètres obtenus avec l'huile essentielle d'*Origanum vulgare*.

**c- Action des huiles essentielles de *Mentha pulegium* et *Lavandula stoechas* :**

Les résultats du screening antibactérien tableau 13 et 14 montrent que l'huile essentielle de *Lavandula stoechas* est sans aucun effet sur toutes les souches Gram négatif testées et certaines souches Gram positives.

Alors que pour l'huile essentielle de la *Mentha pulegium*, à l'exception de cinq souches Gram négatif et trois souches Gram positif qui se sont montrées insensibles, l'huile essentielle de cette plante révèle une activité antibactérienne modérée à l'égard de certaines bactéries Gram positif et Gram négatif, avec des diamètres variant entre 12 et 30 mm.

**Tableau 13 :** Diamètres des zones d'inhibition des huiles essentielles de *Mentha pulegium* et *Lavandula stoechas* vis à vis des souches Gram négatif

| Souches bactériennes | Diamètres des zones d'inhibition | |
|---|---|---|
| | **H.E de *Mentha pulegium*** | **H.E de *Lavandula stoechas*** |
| *Salmonella* A1 | 0 mm | 0 mm |
| *Salmonella* A2 | 0 mm | 0 mm |
| *Salmonella* A3 | 12 mm | 0 mm |
| *Salmonella* A4 | 0 mm | 0 mm |
| *Salmonella* A5 | 0 mm | 0 mm |
| *Salmonella* A6 | 12 mm | 0 mm |
| *Salmonella* A7 | 0 mm | 0 mm |
| *E. Coli* B1 | 12 mm | 0 mm |
| *E. Coli* B2 | 12 mm | 0 mm |
| *E. Coli* B3 | 12 mm | 0 mm |
| *E. Coli* B4 | 16 mm | < 6 mm |
| *E. Coli* B5 | 0 mm | 0 mm |

**Tableau 14 :** Diamètres des zones d'inhibition des huiles essentielles de *Mentha pulegium* et *Lavandula stoechas* vis à vis des souches Gram positif.

| Souches bactériennes | Diamètres des zones d'inhibition | |
|---|---|---|
| | **H.E de *Mentha pulegium*** | **H.E de *Lavandula stoechas*** |
| *Staphylococcus aureus* C1 | 23 mm | 20 mm |
| *Staphylococcus aureus* C2 | 30 mm | 33 mm |
| *Staphylococcus aureus* C3 | 25 mm | 27 mm |
| *Staphylococcus aureus* C4 | 28 mm | 30 mm |
| *Streptococcus* D1 | 20 mm | 16 mm |
| *Streptococcus* D2 | 0 mm | 0 mm |
| *Streptococcus* D3 | 0 mm | 0 mm |
| *Streptococcus* D4 | 0 mm | 15 mm |
| *Streptococcus* D5 | 24 mm | 15 mm |

Pour l'ensembles des huiles essentielles testées. L'activité de ces huiles varie en fonction de type de Gram des bactéries. Pour la même quantité d'huiles essentielles (20µl) déposée, les Gram positif étaient les plus sensibles.

L'histogramme ci dessous (figure 29) montre bien cette différence de réaction entre les souches Gram négatif et Gram positif à l'égard des quatre huiles essentielles testées.

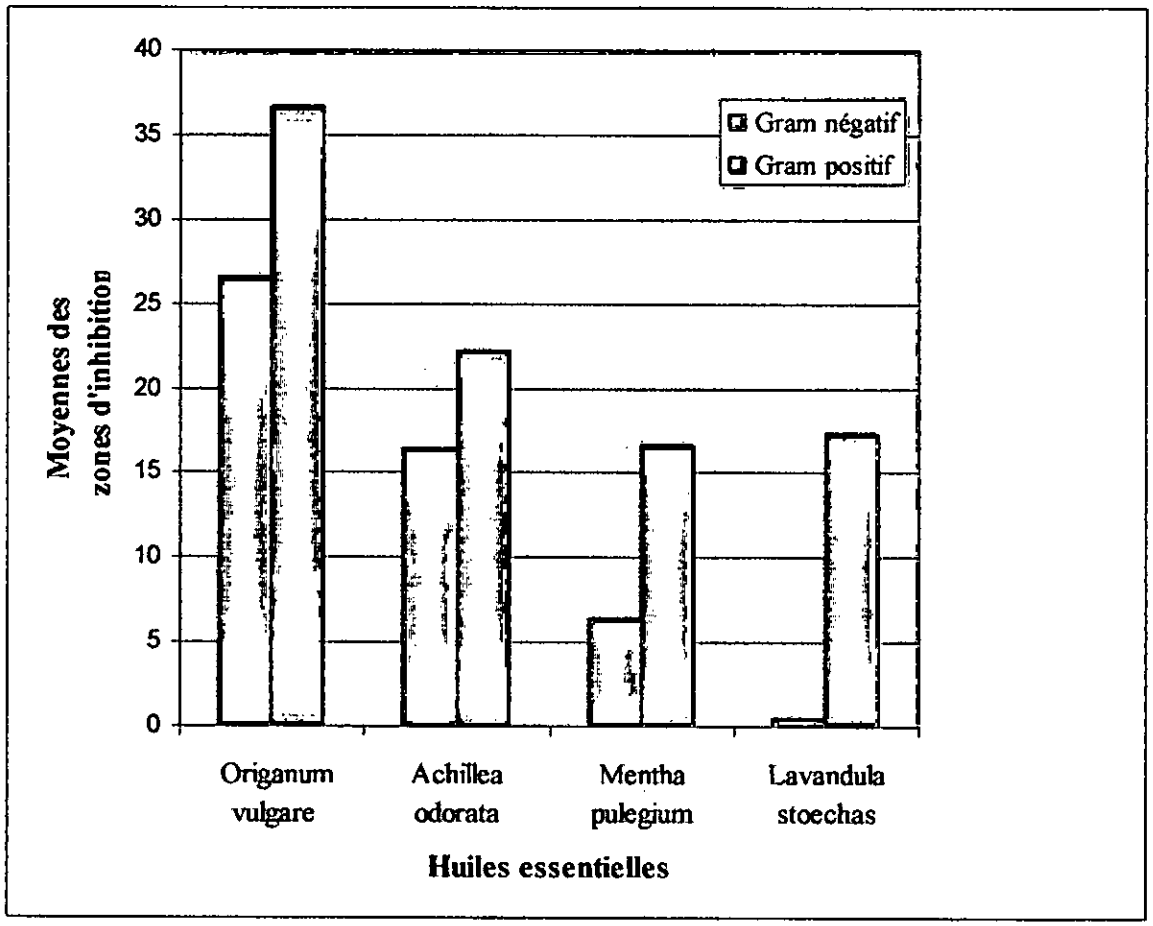



**Figure 29 :** Comparaison entre les moyennes des zones d'inhibition entre les bactéries Gram positif et Gram négatif pour les quatre huiles essentielles

**d- Quantité minimal inhibitrice pour l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* :**

Les résultats du tableau 15 indiquent que la quantité minimale inhibitrice varie entre 10% et 4% pour les souches Gram négatif et entre 10% et moins de 4% pour les souches Gram positif . C'est résultats sont en accord avec les résultats du screening antibactérien ou on a trouvé que les souches Gram positif sont plus sensibles que les souches Gram négatif.

**Tableau 15 :** Quantité minimale inhibitrice pour l'huile essentielle d'*Origanum vulgare.*

| Souches bactériennes | Quantité minimale Inhibitrice |
|---|---|
| *Salmonella* A1 | 10 % |
| *Salmonella* A2 | 10 % |
| *Salmonella* A3 | 10 % |
| *Salmonella* A4 | 5 % |
| *Salmonella* A5 | 10 % |
| *Salmonella* A6 | 10% |
| *Salmonella* A7 | 10 % |
| *E. coli* B1 | 4 % |
| *E. coli* B2 | 5 % |
| *E. coli* B3 | 5 % |
| *E. coli* B4 | 4 % |
| *E. coli* B5 | 5 % |
| *Staphylococcus aureus*C1 | 5 % |
| *Staphylococcus aureus*C2 | 10 % |
| *Staphylococcus aureus*C3 | > 3.33 % |
| *Staphylococcus aureus*C4 | 10 % |
| *Streptococcus* D1 | 10 % |
| *Streptococcus* D2 | 4 % |
| *Streptococcus* D3 | 10 % |
| *Streptococcus* D4 | 5 % |
| *Streptococcus* D5 | 20 % |

### 5.1.2. Résultats des tests antifongiques:

Un effet inhibiteur des quatre huiles essentielles testées sur le développement du dermatophyte a été constaté puisque aucune croissance mycélienne n'a été observée et cela pour une durée d'incubation de plus de 20 jours dans les boites contenant les huiles essentielles, alors que la croissance a eu lieu normalement dans la boite gélosée témoin sans huiles essentielles (figure30).

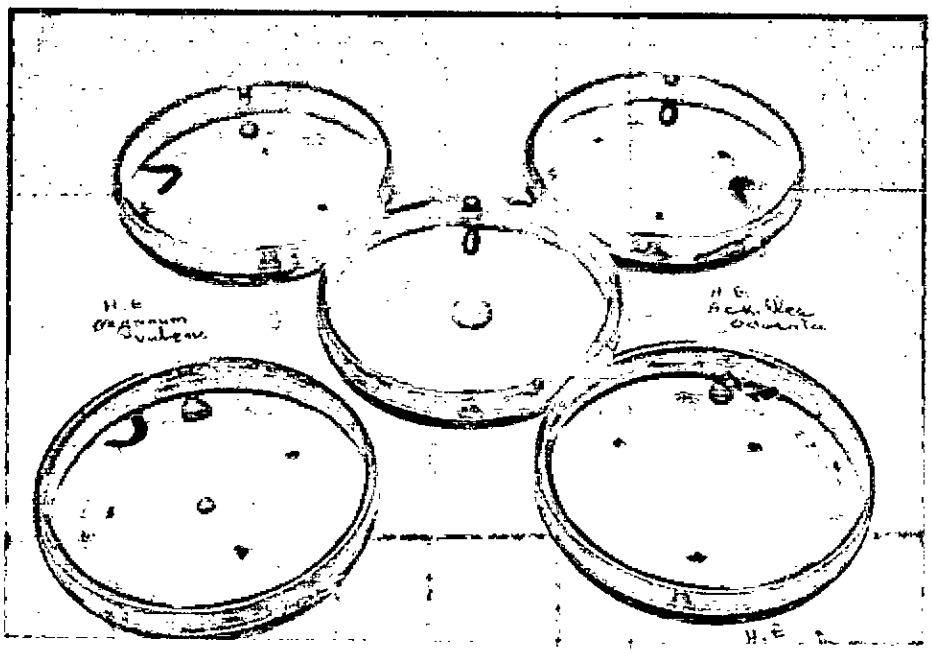
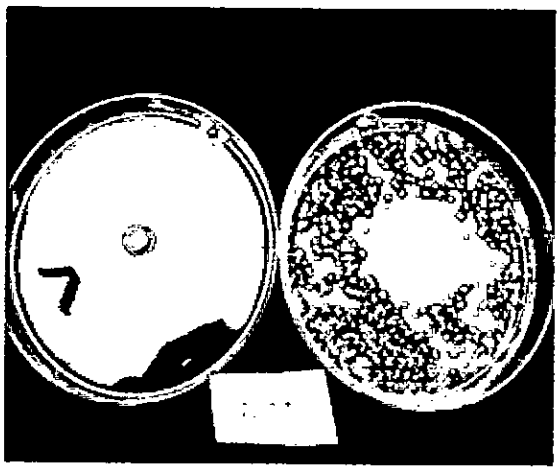


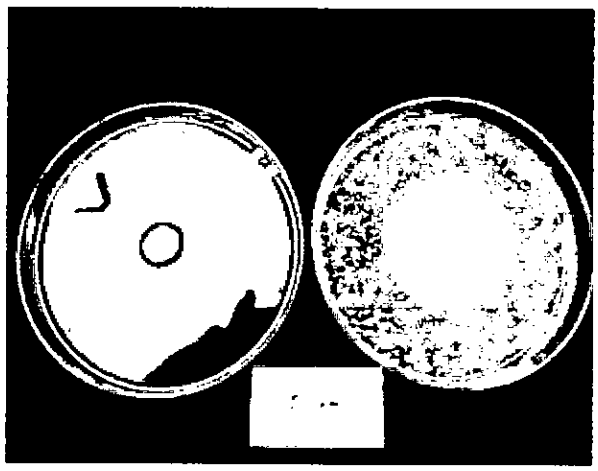
**Figure 30 :** Effets des quatre huiles essentielles sur le développement du *Microsporum spp.*

### 5.2 Méthode des microatmosphères :

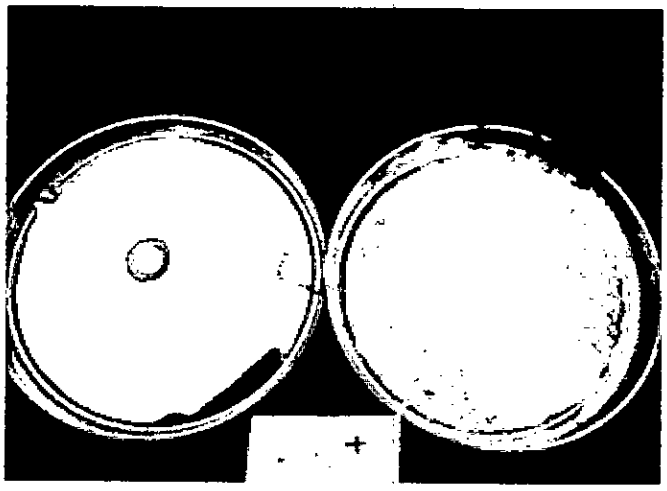
L'activité de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* sur les souches testées, par la méthode des microatmosphères est observée aussi sous forme d'halos d'inhibition de croissance bactérienne comme le montre la figure 31.



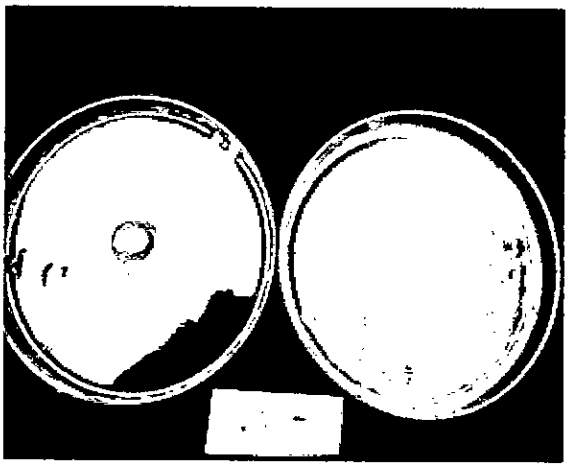
*Staphylococcus aureus*C2



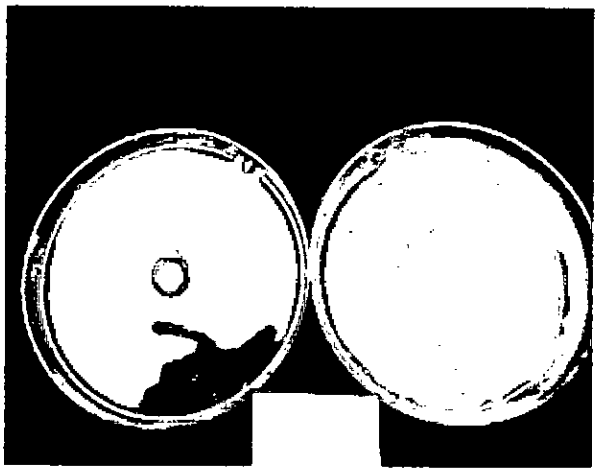
*Staphylococcus aureus*C5



*Escherichia coli*B4



*Salmonella*A3



*Salmonella*A2

**Figure31:** Zones d'inhibition formées selon la méthode des microatmosphères

Les résultats de la mesure de ces diamètres selon la méthode des microatmosphères et qui sont également obtenus selon la méthode de diffusion en puits pour les mêmes souches sont groupés dans le tableau 16.

**Tableau 16 :** diamètres des zones d'inhibition de l'huile essentielle *Origanum vulgare* vis à vis des cinq souches testées selon les deux méthodes.

| Souches bactériennes | Diamètres des zones d'inhibition en mm | |
|---|---|---|
| | **Méthode de diffusion en puits** | **Méthode des microatmosphères** |
| *Staphylococcus aureus* C5 | 46 mm | 45 mm |
| *Staphylococcus aureus* C2 | 36 mm | 38 mm |
| *E.coli* B4 | 35 mm | 37 mm |
| *Salmonella* A3 | 27 mm | 30 mm |
| *Salmonella* A2 | 23 mm | 25 mm |

A partir du tableau nous constatons que les résultats de diffusion en puits sont très proches de ceux obtenus par la méthode des microatmosphères.

**6. Résultats de l'évaluation de l'effet scavenger des quatre huiles essentielles :**

Pour évaluer la capacité de piégeage des radicaux libres *in vitro* des huiles essentielles à tester, nous avons déterminé le pourcentage de réduction du DPPH°, radical libre stable.

Dans le tableau (17) et la figure (32) sont groupés les mesures des différents pourcentages de réduction de chaque extrait ainsi que celui de la Quercitine.

On remarque que l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* possède un effet scavenger très puissant, il réduit la concentration du radical DPPH° avec un pourcentage de 81.03 %.

**Tableau 17 :** Pourcentage de réduction pour les quatre huiles essentielles.

| Extrait pur | Pourcentage de réduction |
|---|---|
| Huile essentielle d'*Origanum vulgare* | 81.03 % |
| Huile essentielle *Lavandula stoechas* | 10.98 % |
| Huile essentielle *Achillea odorata* | 8.19 % |
| Huile essentielle *Mentha pulegium* | 1 % |
| Quercitine | 77 % (à $10^{-1}$ M) |

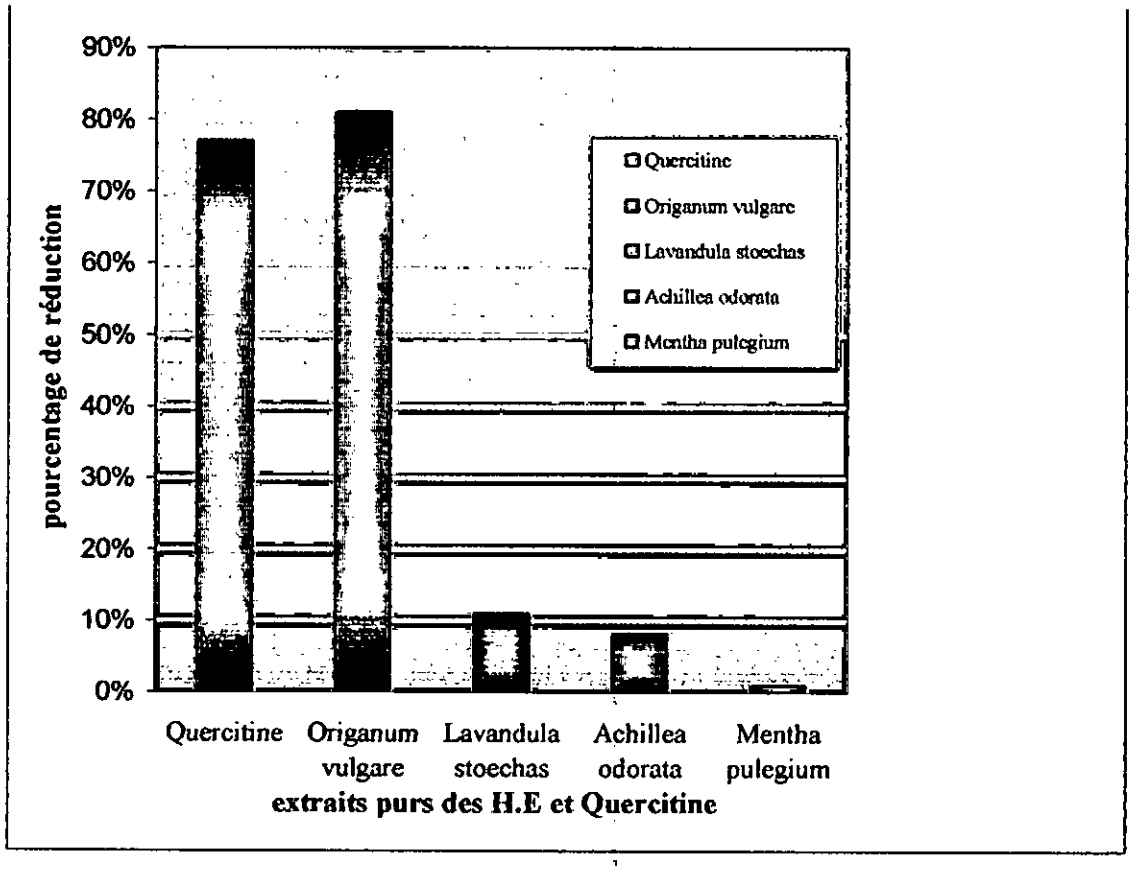



**Figure 32 :** Effets scavenger de l'extrait éthanolique de la quercitine et des extraits purs des huiles essentielles vis à vis du radical DPPH° *in vitro*.

# Discussion

# III. Discussion :

L'examen des données bibliographiques fait apparaître d'emblée la diversité des méthodologies utilisées pour mettre en évidence l'activité antimicrobienne des huiles essentielles. L'insolubilité des huiles essentielles dans l'eau et d'une manière générale dans les milieux aqueux largement utilisés en microbiologie, est une explication de la variété des techniques utilisées.
La méthode de diffusion en puits a été la technique choisie pour mettre en évidence l'activité antimicrobienne *in vitro* de nos quatre huiles essentielles. En revanche la technique des microatmosphères a été uniquement appliquée pour l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* afin d'exploiter les propriétés antibactériennes de la phase volatile.

L'étude *in vitro* de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles des quatre plantes : *Origanum vulgare*, *Achillea odorata*, *Mentha pulegium* et *Lavandula stoechas*, par la méthode de diffusion en puits a montré que ces huiles exercent une activité variable sur l'ensemble des souches microbiennes testées. L'huile essentielle d'*Origanum vulgare* était l'extrait le plus actif.

En effet, les propriétés antimicrobiennes de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* sont connues [115].
Cette grande activité observée peut être liée à la présence de thymol qui est majoritaire dans cette huile (25,30%). Ce composé phénolique est connu pour ses propriétés antimicrobiennes [11,124], [26, 57]. Le thymol est responsable de l'activité fongicide [10] et bactéricide des huiles essentielles qui en contient [28, 71, 127].
La molécule de thymol a un effet inhibiteur et létal sur diverses souches dont *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, sur les quelles elle provoque des fuites d'ions potassium ($K^+$) [127].
La fuite d'ions $K^+$ est le premier indicateur du dommage de la membrane des microorganismes [70].
Plusieurs études ont montré que la repture membranaire contribue au monde d'action des phénols tel que le thymol [64, 114,119, 127].

Tout comme l'huile essentielle d'*Origanum vulgare*, celle d'*Achillea odorata* témoigne d'une activité antibactérienne intéressante surtout contre les bactéries Gram positif.

Cette huile s'est révélée aussi active sur la souche fongique *Microsporum spp* impliquée dans les infections dermatophytiques animales, le cas de l'espèce *Microsporum gypseum* qui se présente comme un parasite occasionnel [20].

On peut supposer que l'activité de cette huile est due à une présence assez forte dans sa composition chimique de 1.8 cinéole (23.35%). Le 1.8 cinéole qui est un terpène oxygéné aussi connu sous le nom d'eucalyptol, et grâce à ces propriétés antimicrobiennes connues [1,94,99,123], il est largement utilisé dans les préparations pharmaceutiques et les produits alimentaires.
Cependant, les composés majoritaires ne sont pas les seuls responsables de l'intégralité de l'activité : la totalité de la composition chimique doit être prise en compte [26,69].
L'alpha terpinéol par exemple ne représente que 10.16% de la composition chimique de cette huile (*Achillea odorata*), mais ce composé est l'un des composés terpéniques alcooliques connus pour leur activité létale et qui agissent en dénaturant les protéines comme solvants ou comme agents de déshydratation [37].

A l'inverse, les huiles essentielles de *Mentha pulegium* et *Lavandula stoechas* et bien qu'elles ont inhibé la croissance de la souche fongique, elles paraissent en revanche moins actives contre les bactéries et surtout les Gram négatif.
Ce faible pouvoir inhibiteur de ces deux huiles pourrait s'expliquer par l'absence de composés cités ci dessus. Ils sont remplacés par des cétones. La pulégone était le composant majoritaire (75,42%) de l'huile essentielle de *Mentha pulegium*, celle de *Lavandula stoechas* était dominée par le fenchone (50,93%). Cette similarité de dominance de ce constituant a été aussi constatée pour l'huile essentielle de *Lavandula stoechas* de Grèce avec un pourcentage de 30,93%, par contre celle de Turquie a été dominée par la pulégone (40,37%) [47,64].

Ainsi, dans une étude réalisée par Kutita et al [67,68], ces derniers ont classé les composés aromatiques purs selon leur activité antifongique vis a vis de sept champignons. Cette activité a été estimée selon la durée d'inhibition de la croissance déterminée par simple observation macroscopique. Ils ont trouvé que cette activité antifongique décroît selon le type de la fonction chimique :

+ Phénols > Alcools > Aldéhydes > Cétones > Ethers > Hydrocarbures -

A la lumière de nos résultats, nous avons constaté que les quatre huiles essentielles testées se sont montrées plus actives à l'égard des bactéries Gram positif par rapport à celles à Gram négatif. Même en déterminant la quantité minimale inhibitrice pour l'huile essentielle d'*Origanum vulgare*, les Gram négatif étaient les plus résistantes (leurs quantités minimales inhibitrices étaient comprises entre 10% et 4%).

Ces résultas sont en corrélation avec la littérature qui confirme que les bactéries Gram négatif sont les plus résistantes aux huiles essentielles [26,33,41,117]. Cette résistance des bactéries Gram négatif n'est pas surprenante, elle est en relation avec la nature de leur membranes externes qui leurs confèrent une résistance à la plupart des agents biocides [84,120].

En effet, la paroi des bactéries à Gram négatif (figure 33) est composée de deux éléments : le péptidoglycane et une membrane externe qui est absente chez les Gram positif (figure 34). Cette membrane surmonte le péptidoglycane et comporte deux feuillets dont la constitution diffère l'un de l'autre. Alors que le feuillet interne est composé de phospholipides similaires à ceux de la membrane cytoplasmique, le feuillet externe est composé d'un complexe appelé : le lipopolysaccharide (LPS) [14].

Ce complexe présente une barrière contre les substances hydrophobes et les macrolides [55,56,91].Ce qui permet aux bactéries Gram négatif de présenter une résistance à l'égard des détergents et les antibiotiques hydrophobes par rapport aux bactéries Gram positif [91].

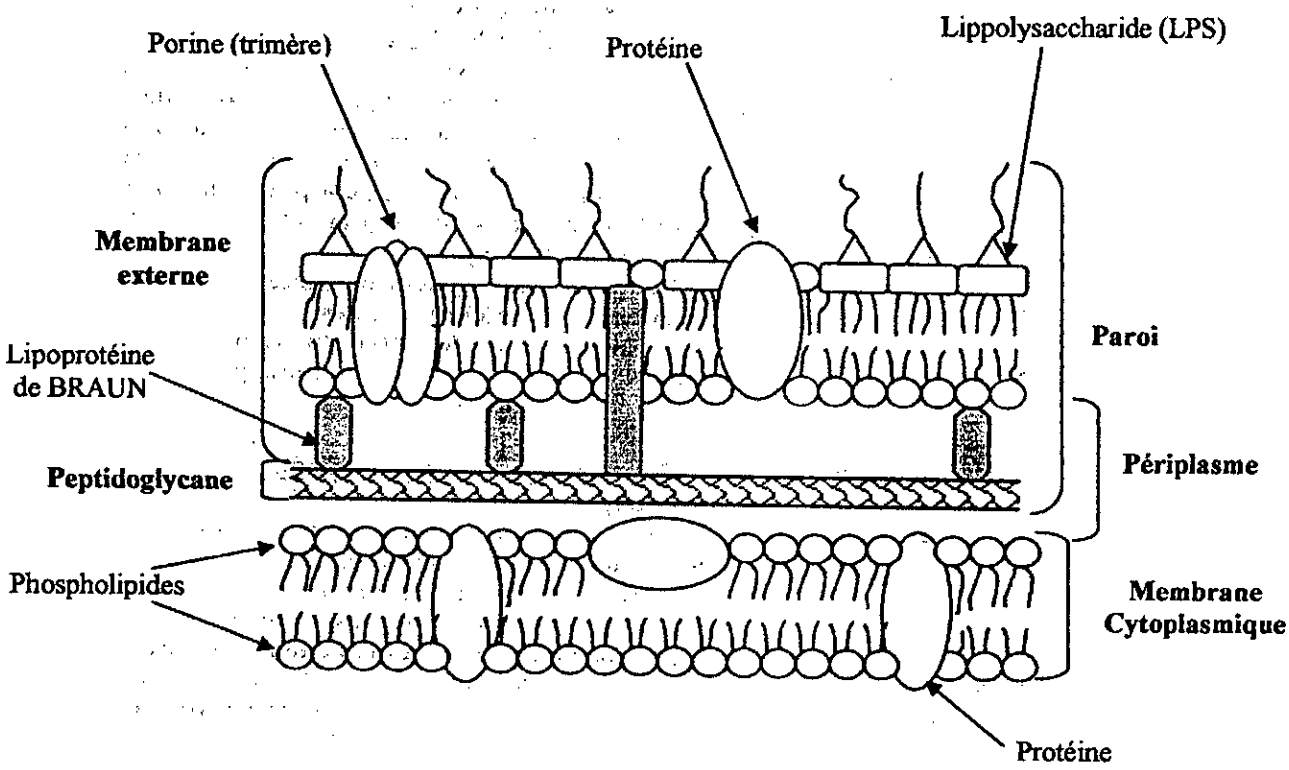



**Figure 33 :** Structure schématique de la paroi des bactéries à Gram négatif [14].

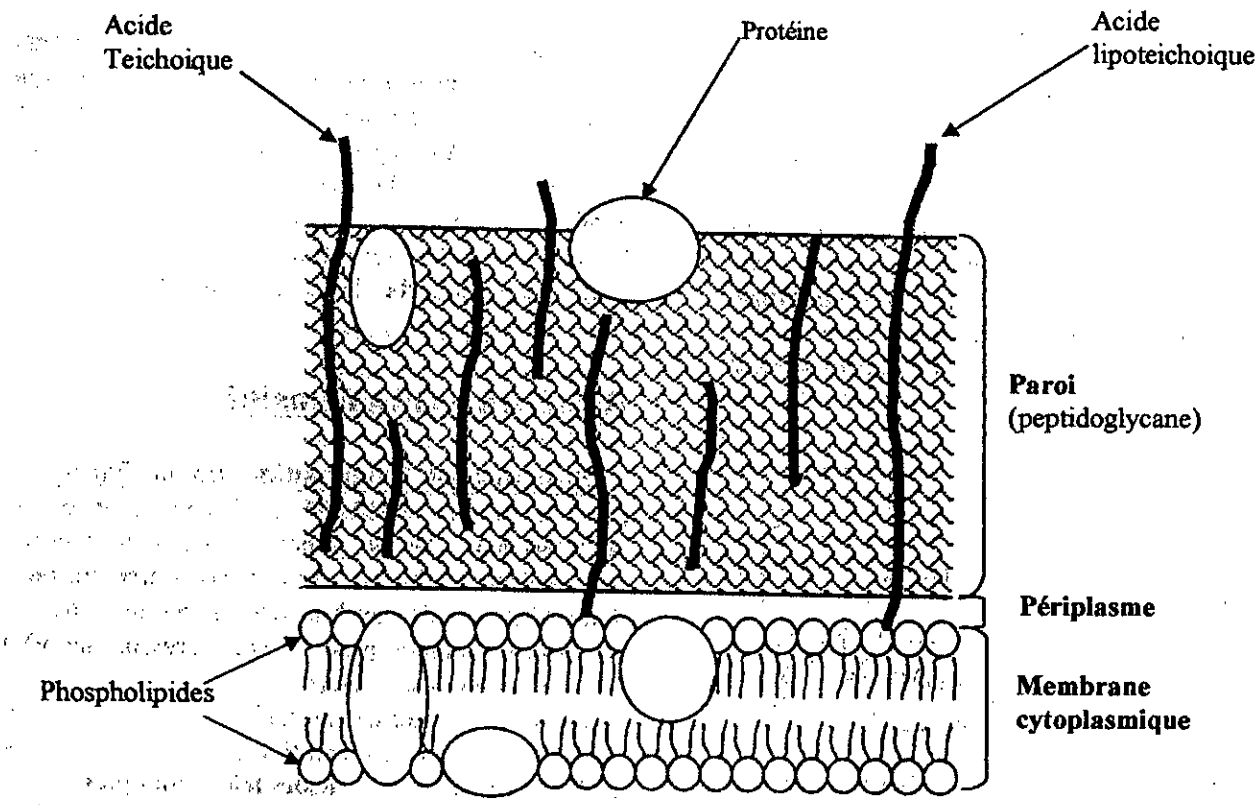



**Figure 34 :** Structure schématique de la paroi des bactéries à Gram positif [14].

Dans un deuxième temps, et afin de vérifier les propriétés antibactériennes de la phase volatile de l'huile la plus active (huile essentielle d'*Origanum vulgare*), nous avons appliqué la technique des microatmosphères.

Les diamètres des zones d'inhibition obtenus étaient pratiquement les mêmes en comparaison avec ceux obtenus par la méthode de diffusion en puits avec les mêmes souches testées.

Les diamètres très semblables pourraient s'expliquer par le fait que la diffusion des composés aromatiques de l'huile essentielle se fait essentiellement dans la phase gazeuse ; ceci à cause de leur très faibles solubilités. La diffusion en surface et dans le volume de la gélose étant alors beaucoup plus lente.

Pour l'étude de l'activité antiradicalaire ou activité de piégeage du radical DPPH° des quatre huiles essentielles, nos résultats ont montré que les trois huiles essentielles d'*Achillea odorata*, *Lavandula stoechas* et *Mentha pulegium* n'ont pas présenté un effet scavenger. Par contre l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* était l'extrait qui a présenté un puissant effet piégeur contre ce radical libre, avec un poucentage de réduction de 81,03%, alors que la Quercitine, utilisé comme témoin a présenté un poucentage de 77% à $10^{-1}$M.

L'important effet scavenger exercé par l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* est probablement lié à sa composition chimique. Il est connu que la présence des composés phénoliques notamment le thymol (composé majoritaire dans cette huile) augmente le pouvoir antiradicalaire de l'extrait [107]. Mis à part ce monoterpène oxygéné réputé actif, on ne peut pas négliger la présence d'autres composés quoique minoritaires pouvant aussi contribuer à l'activité globale de l'huile essentielle ; l'activité antioxydante de la molécule du Gamma terpinène par exemple est comparable à celle de l'alpha tocophérol ; ce dernier se présentant comme étant un puissant antioxydant.

# Conclusion

# Conclusion :

Les huiles essentielles, traitées dans ce présent travail, et qui sont connues pour leurs vertus thérapeutiques présentent des propriétés biologiques importantes dont une activité antimicrobienne et antiradicalaire non négligeables.

Ces propriétés sont et seront toujours liées à leurs compositions chimiques : c'est ce que nous avons prouvé expérimentalement suite aux études faites sur les quatre huiles essentielles que nous avons traitées, notamment celle d'*Origanum vulgare* qui a manifesté une plus grande activité antimicrobienne et antiradicalaire qui était loin d'être surprenante vu la présence des composés phénoliques tels que le thymol. Ces derniers étant traditionnellement connus pour leurs propriétés antimicrobiennes et antioxydantes.

Il est clair, que les résultats de notre travail, nous paraissent d'emblée intéressants et apportent une validation à l'utilisation traditionnelle de ces espèces végétales.

Ainsi donc, notre étude a confirmé les propriétés antimicrobiennes *in vitro* de certains composés à travers la réelle efficacité des huiles essentielles, d'*Origanum vulgare*, *Achillea odotata*, *Lavandula stoechas* et *Mentha pulegium* ce qui leur offre la possibilité d'être employées, par exemple à titre de complément d'une antibiothérapie ou être proposées comme matières actives dans des formulations contre les infections mycosiques animales.

L'huiles essentielle d'*Origanum vulgare* dotée aussi d'un important pouvoir scavenger pourrait avoir une application dans de nombreux domaines, dont l'alimentaire, la cosmétologie, et la thérapie.

En perspectives, il serait -peut être – intéressant de tester expérimentalement l'association de ces huiles essentielles, la séparation de leurs différents composants aromatiques et cela dans le but de vérifier l'effet obtenu.

D'après leurs propriétés antimicrobiennes en relation avec leur phase volatile, ces huiles essentielles peuvent être utilisées comme facteurs d'assainissement de l'air de certains milieux tels que les hôpitaux afin d'éliminer le plus possible de germes nosocomiaux.

D'autres études s'avèrent aussi nécessaires pour évaluer le potentiel *in vivo* de ces huiles sur des modèles animales.

# Références bibliographiques

[1]. **Aligiannis N., Kalpoutzakis E., Chinou I. B., Mitakou S., Gikas E et Tsarbopoulos A.,** (2000), Composition and antimicrobial activity of the essential oils of five taxa of Sideritis from Greece, J. Agric. Food Chem, 49- (811-815).

[2]. **Archer B. L.,** (1980), Polyisoprene, In Bell (E. A) & Charlwood (B.V), Secondary plant product, Berlin Heidelberg New York, Springer-Verlag, (309-327).

[3]. **Arpino P., Prévôt A., Serpinet J., Tranchant J., Vergnol A et Witier P.,** (1995), Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse, Masson, Paris.

[4]. **Association Française de Normalisation.,** (1986), Recueil de normes Françaises, Huiles essentielles, AFNOR, Paris, AFNOR NF T 75-006.

[5]. **Barnes J., Anderson L. A et Phillipson J. D.,** (2002). Herbal Medicines , a guide for health-care proffessionals, London , The Pharmaceutical Press.

[6]. **Baytop T.,** (1984), Medicinal and toxic plants of Turkey, Ismail Akgun Press, Istanbul, (316-317).

[7]. **Bektas T., Erol D., Mehmet U., Ferda C., Dimitra D., Gülhan Vardar-Unlu., Moschos P et Atalay S.,** (2003), Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of Salvia cryptantha (Montbret et Aucher ex Benth.) and Salvia multicaulis (Vahl), Food Chemistry, volume 84, 4– (519-525).

[8]. **Belaiche P.,** (1979), L'aromatogramme, traité de phytothérapie et d'aromathérapie, M, S, A, Editeur, Paris, Tome 1- (204).

[9]. **Belghazi L., Lahlou M., Alaoui Ismaili M., Aboussaouira T., Habti N., Tantaoui Iraki A., Talbi N., Blaghen M et Fellat Zerrouk K.,** (2002), Extraction et analyse par chromatographie en phase gazeuse de l'huile essentielle de la Menthe pouliot, Test antifongique, Biochimie et Santé, (38-40).

[10]. **Bennis S et Chami S. F.**, (2004), Surface alteration of *Saccharomyces cervisiae* induced by thymol and eugenol, Letters in Applied Microbiology, 38- (454-458).

[11]. **Bloch K., Chaykin A., Phillips A. H et Waard A.**, (1959), Mevalonic acid pyrophophate and isopentenyle-pyrophosphate, J. Biol. Chem, 234 - (2595-2604).

[12]. **Bouaziz O.**, (2002), Cours de D. E vétérinaire : pathologie de la mamelle, Université de Constantine, p 51.

[13]. **Bouhdid S., Idaomar M., Zhiri A., Baudoux D., Skali N. S et Abrini J.**, (2006), Thymus essential oils :chemical composition and *in vitro* antioxidant and antibacterial activities, Biochimie, Substances Naturelles et Environnement, (324 -327).

[14]. **Bousseboua H.**, (2005), Eléments de microbiologie, Editions Campus Club, p (46-47).

[15]. **Bruneton J.**, (1993), Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, Edition Tec & Doc, Lavoisier, Paris, (387-466).

[16]. **Bruneton J.**, (1999), Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, Editions Tec & Doc, Editions médicales internationales (1120).

[17]. **Burt S. A et Reinders R. D.**, (2003), Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7, Letters in Applied Microbiology, 36 (3)- (162-167).

[18]. **Cane D. E., Abell C., Harrison P. H. M., Hubbard B. R., Kane C. T., Lattman R., Olivier J. S et Weiner S. W.**, (1991), Terpenoid biosynthesis and the steriochemistry of enzyme-catalyzed allylic addition-elimination reaction, Philos. Trans. R. Soc. London. B, 332- (123-129).

[19]. **Carbonnele F., Marmonier A., Dinon G et Vargues R.**, (1987), Bactériologie médicale, Edition Simep, Sa. Paris.

[20]. **Carlotti N et Bensignor E.,** (1999). Dermatophytosis due to *Microsporum versicolor* or *Microsporum gypseum* in dogs, Vet. Dermatol, 10- (17-27).

[21]. **Carson C. F et Riley T. V.,** (1995), Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of Melaleuca alternifolia, Journal of Applied Bacteriology, 78- (264-269).

[22]. **Casida J. E.,** (1973), Pyrethrum-The natural insecticide, New York, Academic Press.

[23]. **Chaumont J. P et Leger D.,** (1989), Propriétés antifongiques de quelques phénols et de composés chimiquement très voisin, relation structure –activité, Plant Med. Phyto, 23 (2)- (124-126).

[24]. **Connolly J. D et Hill R. A.,** (1992), Dictionary of terpenoids, New York: Chapmann and Hall.

[25]. **Constantin E.,** (1996), Spectrométrie de masse, Lavoisier Tec & Doc, Paris, (1-14).

[26]. **Cosentino S., Tuberoso C. I. G., Pisano B., Satta M., Mascia V., Arzedi E et Palmas F.,** (1999), *In-vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils, Lett Appl Microbiol, 29 (2)- (130-135).

[27]. **Cotelle N., Bernier J. L., Catteau J. P., Pommery J., Wallet J. C et Gaydou E. M.,** (1996), Antioxidant properties of hydroxy-flavones, Free Radic, Biol. Med, 20- (35-43).

[28]. **Cox S. D., Mann C. M., Markham J. L., Bell H. C., Gustafson J. E., Warmington J. R et Wyllie S. G.,** (2000), The mode of antimicrobial action of the essential oil of Melaleuca alternifolia (tea tree oil), Journal of Applied Microbiology, 88 (1)- (170-175).

[29]. **Cuvelier M. E., Berset C et Richard H.,** (1990), Use of a new test for determining comparative antioxidant activity of BHA, BHT, α - and γ- tocopherols and extracts from rosemary and sage, Sci. Aliments, 10– (797-806).

[30]. **Cuvelier M. E., Richard H et Berset C.,** (1992), Comparaison of antioxidant activity of some acids phenols : structure-activity relationship, Biosci. Biotech. Biochem, 56– (324-325).

[31]. **Cuvelier M. E., Richard H et Berset C.,** (1996), Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extrats of sage and rosemary, J. Am. Oil Chem. Soc, 73- (645-652).

[32]. **Dadalioglu I et Evrendilek G. A.,** (2004), Chemical composition and antibacterial effects of essential olis of Turkish oregano (Origanum minutiflorum), bay laurel (Laurus nobilis), Spanish lavender (Lavandula stoechas L), and fennel (Foeniculum vulgare) on common foodborn pathogens, J Agric Chem, 52 (26) - 8255.

[33]. **de Billerbeck G.,** (2000), 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 (236).

[34]. **de Billerbeck G.,** (2005), Huiles essentielles et maladies nosocomiales, La Phytothérapie Européenne, Mai-Juin- (17-20).

[35]. **Deans S. G et Ritchie G.,** (1987), Antibacterial properties of plant essential oils, International Journal of Food Microbiology, 5- (162-180).

[36]. **Didry N., Dubreuil L.,** (1993), Activité antibactérienne du thymol, du carvacrol et de l'aldehyde cinnamique seuls ou associés, Pharmacize, 48(H4)- (301-304).

[37]. **Dorman H. J. D et Deans S. G.,** (2000), Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils, Journal of Applied Microbiology, 88 (2)- (308-316).

[38]. **Eisenreich W., Rohdich F et Bacher A.,** (2001), Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids, Trends Plant Science, *6*- (78-84).

[39]. **Ericsson H. M A et Sherris J. C.,** (1971), Antibiotic sensitivity testing, Report of an International Collaborative Study, Acta path Microbial Scan, B Suppl, 217 : 90.

[40]. **Faleiro M. L et Miguel M. G.,** (2003), Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of Thymus, Lett Appl Microbiol, 36-(1)- (35-40).

[41]. **Farag R. S., Daw Z. Y., Hewedi F. M et El-Baroty G. S. A.,** (1989), Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils, Journal of Food Protection, 52- (665-7).

[42]. **Fauchère J. L et Avril J. L.,** (2002), Bactériologie générale et médicale, Ellipses, Editions Paris, (365).

[43]. **Forbes B. A., Sahm D. F., Weissfeld A. S et Trevino E A.,** (1990), Methods for testing antimicrobial effectiveness, In : Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology, Edition, E. J. Baron, L. R. Peterson and S. M. Finegold, Mosby Co : St Louis, Missouri, (171-194).

[44]. **Franchomme P., Pénoël D et Jollois R.,** (1990), Matière médicale aromatique fondamentale, L'aromathérapie exactement, R. J. Editeur. Limoges, 4- (317-446).

[45]. **Franchomme P., Pénoël D et Jollois R.,** (1990), Thérapeutique, éléments de médecine aromatique, L'aromathérapie exactement, R. J. Editeur. Limoges, 3- (230-316).

[46]. **Garneau F. X.,** (2001), Notes de cours : produits naturels, Département des sciences fondamentales, UQAC. Chicoutimi. Québec.

[47]. **Goren A. C., Topcu G., Bilsel G., Bilsel M., Aydogmus Z et Pezzuto J. M.,** (2002), The Chemical constituents and biological activity of essential oil of Lavandula stoechas ssp. Stoechas, Verlag der Zeitschrift fur Naturforschung, 57c – (797-800).

[48]. **Grieve M.**, (1971), A modern harbal, Dover Publications, New York, Volume1.

[49]. **Griffin S. G et Wyllie S. G.**, (1999), The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity, Flavour and Fragrance Journal, 14- (322-332).

[50]. **Gruenwald J., Brendler T et Jaenicke C.**, (1998), Editors, PDR for herbal medicines. Deuxième édition, Montvale (NJ).Medical Economics Co.

[51]. **Guerin-Faublé V et Brun Y.**, (1999), La résistance aux antibiotiques chez les staphylocoques d'origine animale, Rev. Med. Vet, 150- (299-312).

[52]. **Hammer K. A et Carson C. F.**, (2003), Antifungal activity of the components of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil, Journal of Applied Microbiology, 95 (4)- (853-860).

[53]. **Hartwell J. L.**, (1971), Plants used against cancer-survey, Lioydia, 34– (204-425).

[54]. **Haxhe J. J et Zumofen M.**, (1999), Notions d'hygiène hospitalière, Faculté de Médecine, Université Catholique de Louvain.

[55]. **Helander I. M., Makela P. H., Westphal O et Rietschel E. T.**, (1996), Lipopolysaccharides, In Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine, 3- (462-471).

[56]. **Helander I. M., Alakomi H. L., Latva-kala K., Koski P.**, (1997). Polyethyleneimine is an effective permeabilizer of Gram negative bacteria. Mycrobiology, 143- (3193-3199).

[57]. **Helander I. K., Alakomi H. L., Latva-Kala K., Mattila-Sandholm T., Pol I., Smid E. J et Von Wright A.**, (1998), Characterisation of the action of selected essential oil components on Gram negative bacteria, Journal of Agriculture Food Chemistry, 46- (3590-3595).

[58]. **Hermal C.,** (1993), Activité bactériostatique de sept émulsions d'huiles essentielles et de deux associations d'émulsions d'huiles essentielles, Faculté de Pharmacie, Université de Montpellier, 1 (87).

[59]. **Hmamouchi M.,** (1996), Plantes alimentaires, aromatiques, condimentaires, médicinales et toxiques au Maroc, Unité de Recherche : Plantes Médicinales et Aromatiques, Rabat, (94-96).

[60]. **Hussain A., Virmani O. P., Sherma A., Kumar A et Misra L. N.,** (1988), Major essntial oil bearning plants of India, Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants, Lucknow, India.

[61]. **Kleinig H.,** (1989), The role of plastids in isoprenoid biosynthesis, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol, 40- (39-59).

[62]. **Koba K., Sanda K., Raynaud C., Mandin D., Millet J et Chaumont J. P.,** (2004), Activité antimicrobienne d'huiles essentielles de trois Cymbopogon sp.africains vis-à-vis de germes pathogènes d'animaux de compagnie, Ann. Med. Vet, 148- (202-206).

[63]. **Kokkalou E.,** (1988), The Constituents of the essential oil from Lavandula stoechas growing wild in Greece, Planta Med, 54 – (58-59).

[64]. **Kopecka´-Leı´tmanova A., Devinsky F., Mlynarcik D et Lacko I.,** (1989), Interaction of ADMAOs and quaternary ammonium salts with membrane and membrane-associated processes in *E. coli* cells: mode of action, Drug Metabolism and Drug Interactions, 7- (29–51).

[65]. **Kováts E.,** (1995), Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system, in Advances in Chromatography, Chap, 7- (229-247).

[66]. **Kunle O et Okogun J.,** (2003), Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from Lippia multiflora leaf extract, Phytomedicine, 10- (59-61).

[67]. **Kurita N., Miyaji M., Kurane R., Takahara Y et Ichimura K.,** (1979), Antimicrobial activity of Dalmatian sage oil from differents regions of the Yugoslav Adriatic coast, Agric. Biol. Chem, 43 (11)- 2365.

[68]. **Kurita N., Miyaji M., Kurane R et Takahara Y.,** (1981), Antifungal activity of components of essential oils, Agric. Biol. Chem, 45(4)- 945.

[69]. **Lahlou M.,** (2004), Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils, Phytotherapy Research, 18- (435-448).

[70]. **Lambert P. A et Hammond S. M.,** (1973), Potassium fluxes, first indications of membrane damage in micro-organisms, Biochemical and Biophysical Research Communications, 54- (796–799).

[71]. **Lambert R. J. W., Skandamis P. N., Coote P. J et Nychas G. j. E.,** (2001), A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol, Journal of Applied Microbiology, 91(3)- (453-462).

[72]. **Lambin S et German A.,** (1969), Précis de microbiologie, Masson and C$^{ie}$ Editeurs.

[73]. **Langenheim J. H.,** (1969), Amber: a botanical inquiry, Science, 163 (872)- (1157-1169).

[74]. **Le Minor L.,** (1988), Typing of *Salmonella* species, Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 7– (214-218).

[75]. **Liassine N.,** (2000), Problème des pathogènes Gram négatif résistants aux antibiotiques en milieu hospitalier, Schweiz. Med. Wochenschr, 130- (1930-6).

[76]. **Lis-Balchin M et Hart S. L.,** (2000), Pharmacological and antimicrobial studies on different tea-tree oils, originating in Australia and New Zealand. Phytotherapy Research, 14- (623-629).

[77]. **Lloyd D. H., Lamport A. I et Feeney C.,** (1996), Sensitivity to antibiotics amongst cutaneous and mucosal isolates of canine pathogenic *Staphylococci* in the UK, 1980-96, Vet. Dermatol, 7- (171-175).

[78]. **Longevialle P.,** (1981), Spectrométrie de masse des substances organiques, Masson. Paris, (3-14) et (83-98).

[79]. **Lorenzo D., Paz D., Dellacassa E., Davies P., Vila R et Canigueral S.,** (2002), Essential oils of Mentha pulegium and Mentha rotundifolia from Urguay, Brazilian Archives and Technology, An International Jounal, Volume 45, n 4 – (519-524).

[80]. **Lutzow M et Beyer P.,** (1988), The isopentenyle-diphosphate$\Delta$ -isomerase and its relation to the phytoene synthase complex in Daffodil chromoplasts, Biochem. Biophys. Acta, 959- (118-126).

[81]. **Lynen F., Eggerer H., Henning U et Kessel L,** (1958), Farnesyl pyrophosphat und 3-Methyl $-\Delta^3$ -butenyl-1-pyrophophat, die biologischen vorstufen des squalens, Zur biosynthese der terpene. III – Angew. Chem, 70- (738-742).

[82]. **Mangena T et Muyima N. Y. O.,** (1999), Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of Artemisia afra, Pteronia incana and Rosmarinus officinalis on selected bacteria and yeast strains, Lett. Appli. Microbiol, 28 (4)- (291-296).

[83]. **Manley C. H.,** (1993), Psychophysiological effect of odor, Critical reviews in Food Science and Nutrition, 33- (57-62).

[84]. **Mann C. M., Cox S. D et Markham J. L.,** (2000), The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749 contributes to its tolerance to the essential oil of Melaleuca alternifolia (tea tree oil), Letters in Applied Microbiology, 30- (294-297).

[85]. **Mbata T. I et Saikia A.,** (2005), Antibacterial activity of essential oil From Ocimum gratissimum on *Listeria monocytogenes*, Internet Journal of Food Safety Volume (7) – (15-19).

[86]. **Mitich L. W.**, (1990), Yarrow the herb of Achilles, Weed Technol, 4– (451-453).

[87]. **Molyneux P.**, (2004, The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, Songklanakarin J. Sci. Technol, 26(2) : 211-219.

[88]. **Mujeeb-ur- Rahman et Shereen Gul.**, (2002), Antibacterial activity of hydrodistilled essential oil of Psammogeton canescens N. O. Umbelliferae, Asian Network for Scientific Information, Biotechnology Volume (1) – (55-60).

[89]. **Nauciel C.**, (2000), Bactériologie médicale, Edition Masson, Parie. TSBN, 2- 294 – 00428.

[90]. **Newall C. A., Anderson L. A et Phillipson J. D.**, (1996), Herbal Medicines : a guide for health-care proffessionals, London : The Pharmaceutical Press.

[91]. **Nikaido H.**, (1989), Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance, Antimicrob Agents Chemother, 33- (1831-1836).

[92]. **Ntezurubanza L.**, (2000), Les huiles essentielles de Rwanda, LASEVE-UQAC, Chicoutimi, Québec.

[93]. **Ogura K ET Koyama T.**, (1998), Enzymatic aspects of isoprenoid chaine elongation, Chem. Rev, 4- (1263-1274).

[94]. **Pattnaik S., Subramanyam V. R., Bapaji M et Kole C. R.**, (1997), Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils, Micobios, 89- (39-46).

[95]. **Paupardin C., Leddet C et Gautheret R.**, (1990), Genetics, selection and multiplication : amelioration of Artemisia species (Artemisia ubelliformis and E. genipi) by meristem culture, J. Jap. Bot, (65- 33).

[96]. **Pichersky., Raguso., Lewinsohn et Croteau.,** (1994), Floral scient production in Clarkia (Onagraceae), Location and developmental modulation of monoterpene emission and linalool synthase activity, Plant Physiology Rockville, 106 (4)- (1533-1540).

[97]. **Pouchers W. A,** (1974), Perfumes, cosmetic and soap, Volum1. 8th Ed. Capmann and Hall, London.

[98]. **Prescott J. F., Brad Hanna W. J., Reid-Smith R et Drost K.,** (2002), Antimicrobial drug use and resistance in dogs, Can. Vet. J, 43- (107-116).

[99]. **Prudent D., Perinou F., Bessiere J. M., Michel J et Bravo R.,** (1993), Chemical analysis, bacteriostatic and fungistatic properties of the essential oil of the atoumau from Martinique (Alpinia speciosa), J. Ess. Oil. Res, 5- (255-264).

[100]. **Ramos-Valdivia R., Van der Heijden R., Camara B et Verpoorte R.,** (1994), Purification and characterization of isopentenyl pyrophosphate isomerase from elicitor-treated Cinchona robusta cell suspension cultures, 2nd Symposium of the European Network on Pant Terpenoids. Strasbourg, January, (23-27).

[101]. **Ramos-Valdivia A. C., Van der Heijden R et Verpoorte R.,** (1997), Isopentenyl diphosphat isomerase : a core enzyme in isoprenoid biosynthesis. A review of its biochemistry and function, Nat Prod Rep, Dec, 14 (6)- (591-603).

[102]. **Régnier B.,** (2005), Les infections à l'hôpital, Pour la Science, 331- (74-80).

[103]. **Rohdich F., Kis K., Bacher A et Eisenreich W.,** (2001), The non-mevalonate pathway of isoprenoids : genes, enzymes and intermediates, Curr. Op. Chem. Biol., 5- (535-540).

[104]. **Rohmer M., Knani M., Simonin P., Sutter B et Sahm H.,** (1993), Isoprenoid biosynthesis in bacteria : a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate, J. Biochem, 295- (517-524).

[105]. **Rohmer M.,** (1999), The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants, Nat Prod Rep, 16- (565-547).

[106]. **Rohmer M.,** (1999), Comprehensive natural product chemistry. Isoprenoids including carotenoids and steroids (Cane, D.E., Ed.), Oxford: Pergamon, 2- (45-67).

[107]. **Ruberto G et Baratta M.,** (2000), Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems, Food Chemistry, 4– (167-174).

[108]. **Ruzicka L., Eschenmoser A et Heusser H.,** (1953), The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds, Experientia, 9- (357-396).

[109]. **Saaed M.,** (1970), Hamdard pharmacopia of eastern medicine, Hamdard National Foundation Karachi, Pakistan.

[110]. **Sarbach R.,** (1962), Contribution à l'étude de la désinfection chimique des atmosphères, Faculté de Pharmacie, Université de Rennes (181).

[111]. **Sartoratto A., Machado A. L. M., Delarmelina C., Figueira G M., Duarte M. C. T et Rehder V. L. G.,** (2004), Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil, Brazilian Journal of Microbiology, 35 – (275-280).

[112]. **Schwarz M,** (1994), Terpen-Biosynthese in Ginkgo biloba: eine überraschende Geschichte, PhD Thesis Nb 10951, Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich, Switzerland.

[113]. **Schwarz M et Arigoni D.,** (1999), Comprehensive natural product chemistry. Isoprenoids including carotenoids and steroids (Cane, D.E., Ed.), Oxford: Pergamon, 2- (367-400).

[114]. **Shapiro S et Guggenheim B.,** (1995), The action of thymol on oral bacteria, Oral Microbiology and Immunology, 10– (241–246).

[115]. **Sivropoulou A., Papanikolaou E., Nikolaou C., Kokkini S., Lanaras T et Arsenakis M.,** (1996), Antimicrobial and cytotoxic activities of Origanum essential oils, Journal of Food Chemistry, 44- (1202-1205).

[116]. **Skoula M., Gotsiou P., Naxakis G et Johnson C. B.,** (1999), A chemosystematic investigation on the mono-and sesquiterpenoids in the genus Origanum (Labiatae), Phytochemistry, 52- (649-657).

[117]. **Smith-Palmer A et Stewart J.,** (1998), Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens, Lett Appl Microbiol, 26-(2) – (118- 122).

[118]. **Svoboda K. P.,** (2000), Secretory structures of aromatic and medicinal plant, Microscopix Publications. Powys, UK.

[119]. **Takasaki A., Hashida T., Fukiwara S., Kato K et Nishihara T.,** (1994), Bacterial action of a quaternary ammonium disinfectant, didecyldimethylammonium chloride, against *Staphylococcus aureus*, Japanese Journal of Toxicology and Environmental health, 40- (344–350).

[120]. **Tassou C .C et Nychas G. J. E.,** (1995), Antimicrobial activity of the essential oil of Mastic gum (Pistacia lentiscus var. chia) on Gram positive and Gram negative bacteria in borth and model food systems, International Biodeterioration and Biodegradation, 36- (411-420).

[121]. **Tisserand R.,** (1988), Essential oils as psychotherapeutic agents. Perfumery, the psychology and biology of fragrance, London, New York, Chapmann and Hall, 1- (167-181).

[122]. **Trouillas P., Calliste C. A., Allais D. P., Simon A., Marfak A., Delage C et Duroux J. L.,** (2003), Antioxydant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen plant extracts used in the Limousin countryside as herbel tea, Food Chem, 80- (399-407).

[123]. **Tzakou O., Pitarokili D., Chinou I. B et Harvala C.,** (2001), Composition and antimicrobial activity of essential oil of Salvia ringens, Planta Medica, 67- (81-83).

[124]. **Ultee A., Slump R. A., Steging G et Smid E. J.,** (2000), Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice, Journal of Food Protection, (620-624).

[125]. **Van Den Dool H et Kratz P. D.,** (1963), A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography, J. Chromatog, 11- (463-471).

[126]. **Wallach O.,** (1887), Zur Kenntnis der Terpene und atherischen Oele, Justus Lieb, Ann. Chem, 238- (78-89).

[127]. **Walsh S. E., Maillard J. Y., Russell A. D., Catrenich C. E., Charbonneau D. L et Bartolo R. G.,** (2003), Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and negative bacteria, Journal of Applied Microbiology, 94 (2)- (240-247).

[128]. **Werckenthin C., Cardoso M., Martel J. L et Schwarz S.,** (2001), Antimicrobial resistance in *Staphylococci* from animals, with particular reference to bovine *Staphylococcus aureus*, porcine *Staphulococcus hyicus* and canine *Staphylococcus intermedius*, Vet. Res, 32- (341-362).

[129]. **Wren R. C.,** (1988), Potter's new cyclopedia of botanical drugs and preparation (Revised Willamson and Evans), Saffron and Walden (England), The C. W. Daniel Company Limited.

[130]. **Zaika L. L.,** (1988), Spices and Herbs : their antimicrobial activity and its determination, Journal of Food Safety, 9 (2)- (97-118).

[131]. **Zambonelli A., D'Aurelio A. Z., Severi A., Benvenuti E., Maggi L et Bianchi A.,** (2004), Chemical composition and fungicidal activity of comercial essential oils of Thymus vulgaris L, J. Essent. Oil Res, 16 (1)- (69-74).

# Annexes

**Milieux de culture :**

**Milieu Hektoen :**

| | |
|---|---|
| Peptone | 12 g |
| Extrait de levure | 03 g |
| Lactose | 12 g |
| Saccharose | 12 g |
| Salicine | 02 g |
| Chlorure de sodium | 05 g |
| Thiosulfate de sodium | 05 g |
| Citrate ferrique ammoniacal | 1.5 g |
| Bleu de bromothymol | 0.065 g |
| Fushine acide | 0.1 g |
| Agar | 13 g |
| pH | 7.5 |

**Chapman :**

| | |
|---|---|
| Peptone | 10 g |
| Extrait de viande de boeuf | 01 g |
| Chlorure de sodium | 75 g |
| Mannitol | 10 g |
| Rouge de phénol | 0.025 g |
| Agar-agar | 15 g |
| pH | 7.4 |

**Mannitol mobilité :**

| | |
|---|---|
| Hydrolysat trypsique de caséine | 10 g |
| Peptone de caséine | 17,5 g |
| Nitrate de potassium | 01 g |
| Rouge de phénol | 0.4 mg |
| Agar | 3,5 g |
| pH | 7.2 |

**Bouillon nutritif :**

| | |
|---|---|
| Peptone | 10 g |
| Extrait de viande | 05 g |
| (eventuellement NaCl 5g) | |
| pH | 7.2 |

**TSI :**

| | |
|---|---|
| Extrait de viande | 03 g |
| Extrait de levure | 03 g |
| Chlorure de sodium | 05 g |
| Glucose | 01g |
| Lactose | 10 g |
| Saccharose | 10 g |
| Citrate fer | 0.3 g |
| Peptone | 20 g |
| Thiosulfate de sodium | 0.3 g |
| Rouge de phénol | 0.024 g |
| Agar | 12 à 18 g |
| pH | 7.4 |

**Urée indole :**

| | |
|---|---|
| L.tryptophane | 03 g |
| Monohydrogénophosphate de potassium | 01 g |
| Dihydrogénophosphate de potassium | 01 g |
| Chlorure de sodium | 05 g |
| Urée | 20 g |
| Alcool à 95° | 10 ml |
| Rouge de phénol | 25 mg |
| Eau distillée (qsp) | 1l |
| pH | 6.7 |

**Moeller enrichi par l'ornithine :**

| | |
|---|---|
| L-ornithine | 05 g |
| Extrait de levure | 03 g |
| Chlorure de sodium | 05 g |
| Glucose | 01 g |
| Bromocrésol pourpre | 0,16 mg |
| Ethanol | 1ml |
| pH | 6,8 |

**Moeller enrichi par l'arginine:**

| | |
|---|---|
| L-arginine | 05 g |
| Extrait de levure | 03 g |
| Chlorure de sodium | 05 g |
| Glucose | 01 g |
| Bromocrésol pourpre | 0,16 mg |
| Ethanol | 1ml |
| pH | 6,8 |

**Moeller enrichi par lysine :**

| | |
|---|---|
| L-lysine | 05 g |
| Extrait de levure | 03 g |
| Chlorure de sodium | 05 g |
| Glucose | 01 g |
| Bromocrésol pourpre | 0,16 mg |
| Ethanol | 1ml |
| pH | 6,8 |

**Citrate de Simmons :**

| | |
|---|---|
| Sulfate de magnésium | 0,2 g |
| Citrate de sodium | 01g |
| Hydrogénophosphate de potassium | 01 g |
| Dihydrogénophosphate d'ammonium | 01 g |

| | |
|---|---|
| Chlorure de sodium | 05 g |
| Bleu de bromothymol | 0.08 g |
| Agar | 15 g |
| pH | 7 |

**Clark et Lubs :**

| | |
|---|---|
| Peptone | 05 g |
| Hydrogénophosphate de potassium | 05 g |
| Glucose | 05 g |
| Eau distillée | 1l |
| pH | 7,5 |

**Muller Hinton :**

| | |
|---|---|
| Infusion de viande de boeuf | 300,0 ml |
| Hydrolysat acide de caséine | 17.5 g |
| Amidon de mais | 01.5 g |
| Agar | 17 g |
| pH | 7.4 |

**SFB :**

| | |
|---|---|
| Tryptone | 05 g |
| Lactose | 04 g |
| Hydrogénophosphate disodique dodécahydraté | 10 g |
| Hydrogénoselénite de sodium | 04 g |

**Gélose Sabouraud :**

| | |
|---|---|
| Peptone | 10 g |
| Glucose massé | 20 g |
| Agar | 15 g |
| Eau distillée | 1000 ml |

**Colorants et réactifs :**

**Violet de Gentiane :**

| | |
|---|---|
| Violet de Gentiane | 10 g |
| Ethanol | 100 ml |
| Phénol | 20 g |
| Eau distillée | 1l |

**Lugol :**

| | |
|---|---|
| Iode métalloide $I_2$ | 5 g |
| Iodure de potassium | 10 g |
| Eau distillée | 1l |

**Fuschine :**

| | |
|---|---|
| Fuschine basique | 10 g |
| Ethanol | 100 ml |
| Phénol | 50 g |
| Eau distillée | 1l |

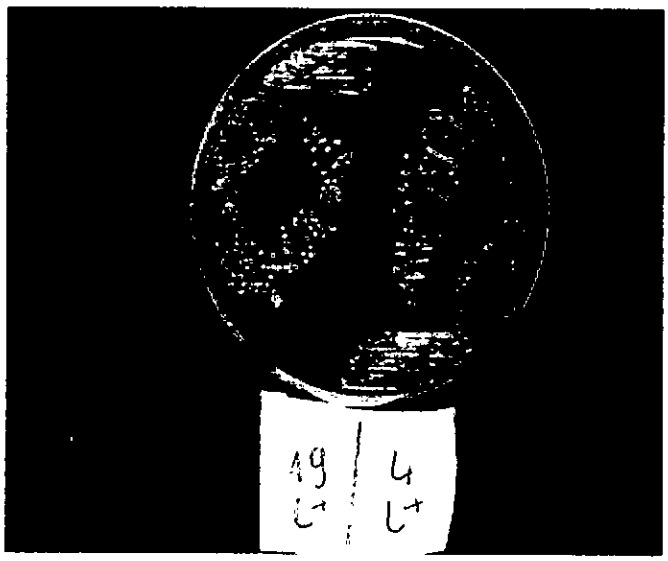
**Kovacs :**

| | |
|---|---|
| Diméthyleamino- 4 benzaldehyde | 05 g |
| Acide chlorhydrique | 25 ml |
| Méthyl-2 butanol-2 | 75 ml |

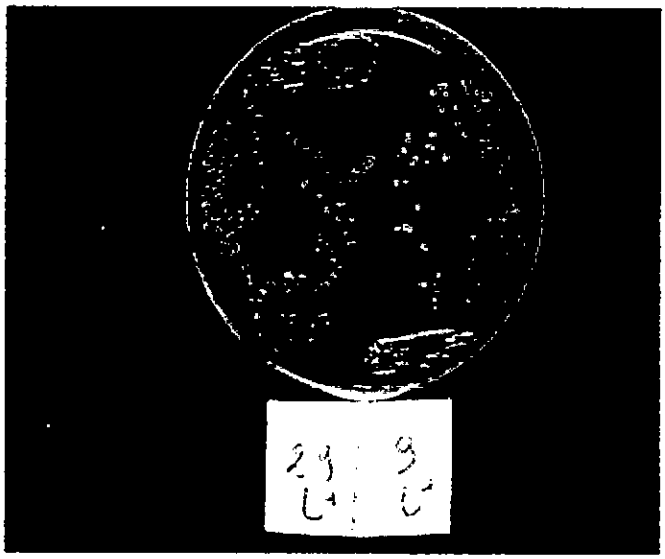
**Solution éthanolique de naphtol 1 :**

| | |
|---|---|
| Naphtol 1 | 06 g |
| Ethanol à 96 % (v/v) | 100 ml |

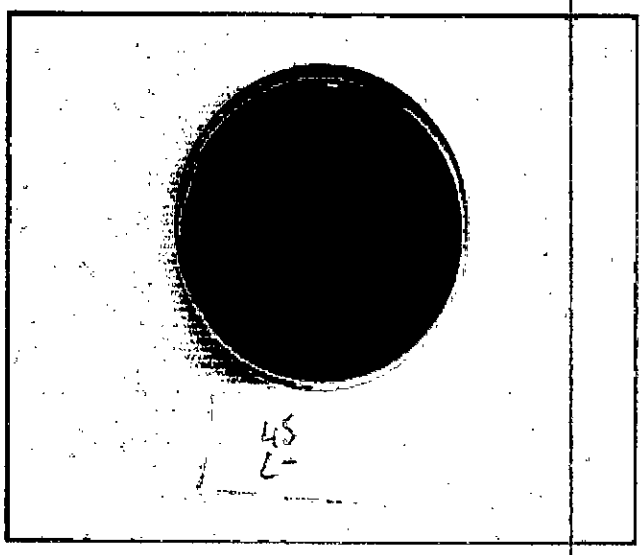
## 1. Isolement des souches :



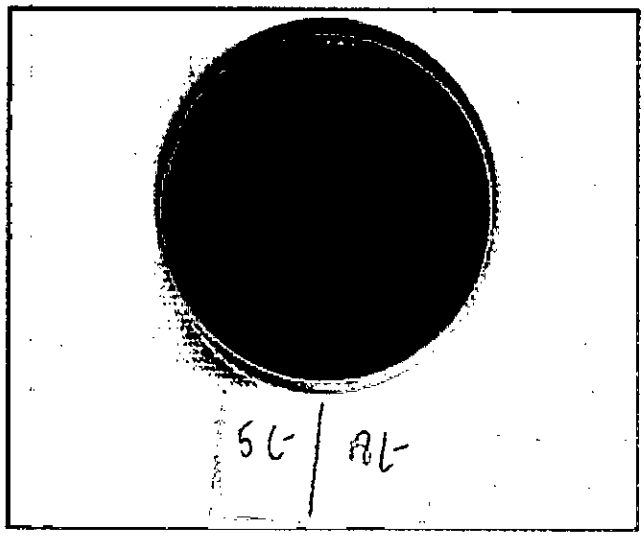
*E.coli* B3/ *E.coli* B2



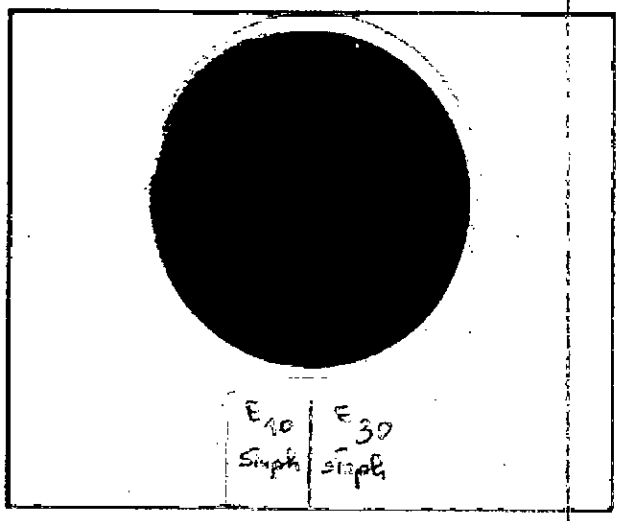
*E.coli* B1/ *E.coli* B4



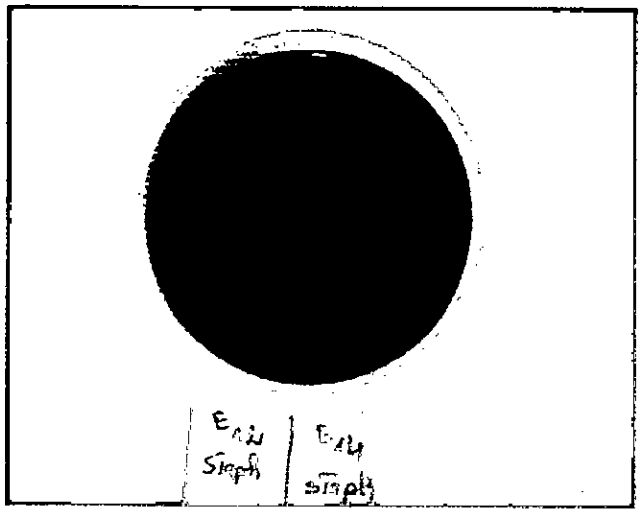
*Salmonella* A3



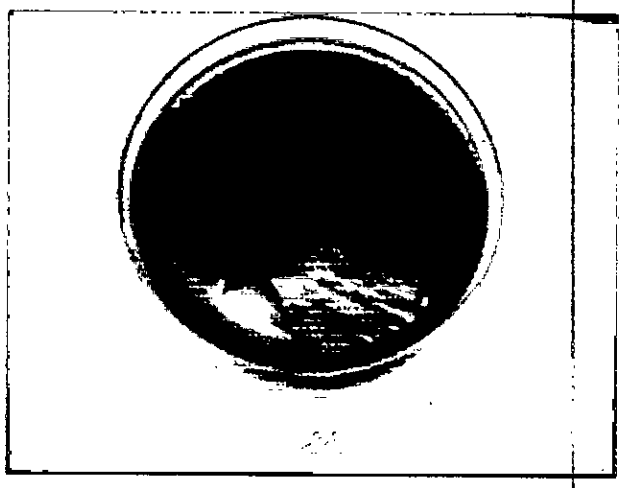
*Salmonella* A2 / *Salmonella* A1



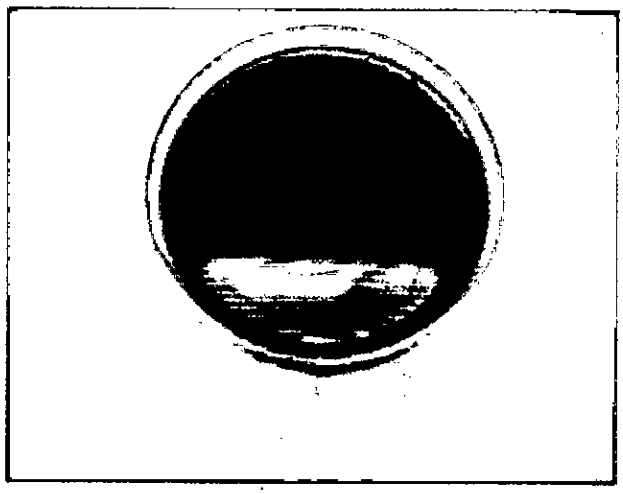

Staphylococcus aureus C4




Staphylococcus aureus C1 / Staphylococcus aureus C3

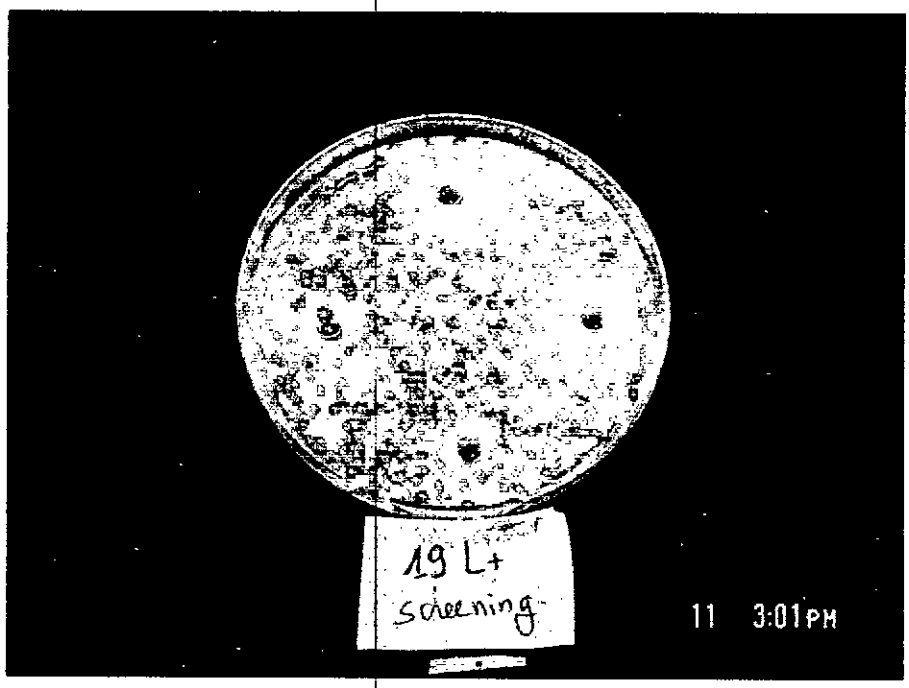


Streptococcus D1

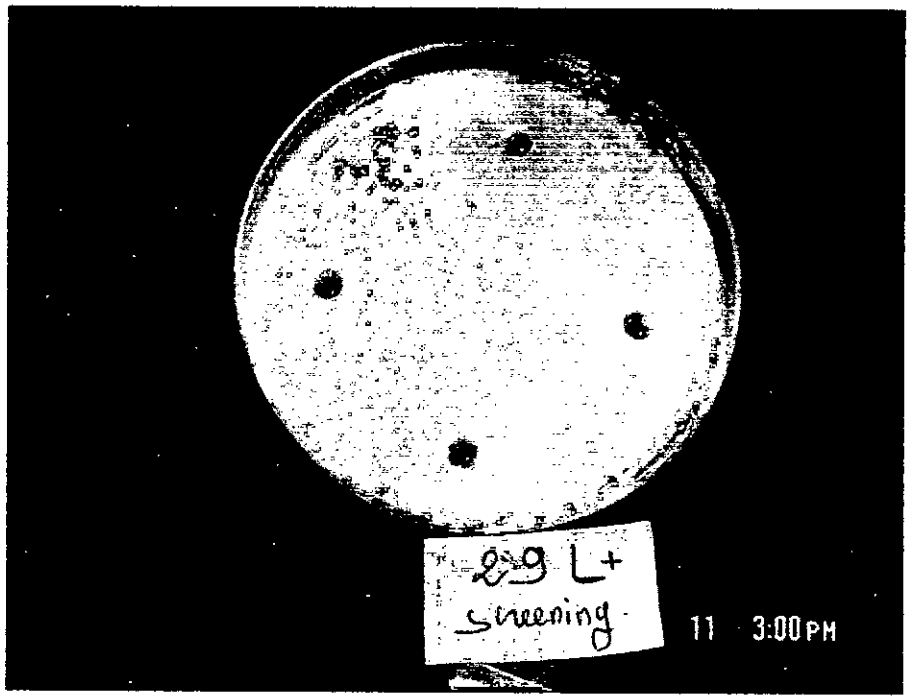


Streptococcus D4

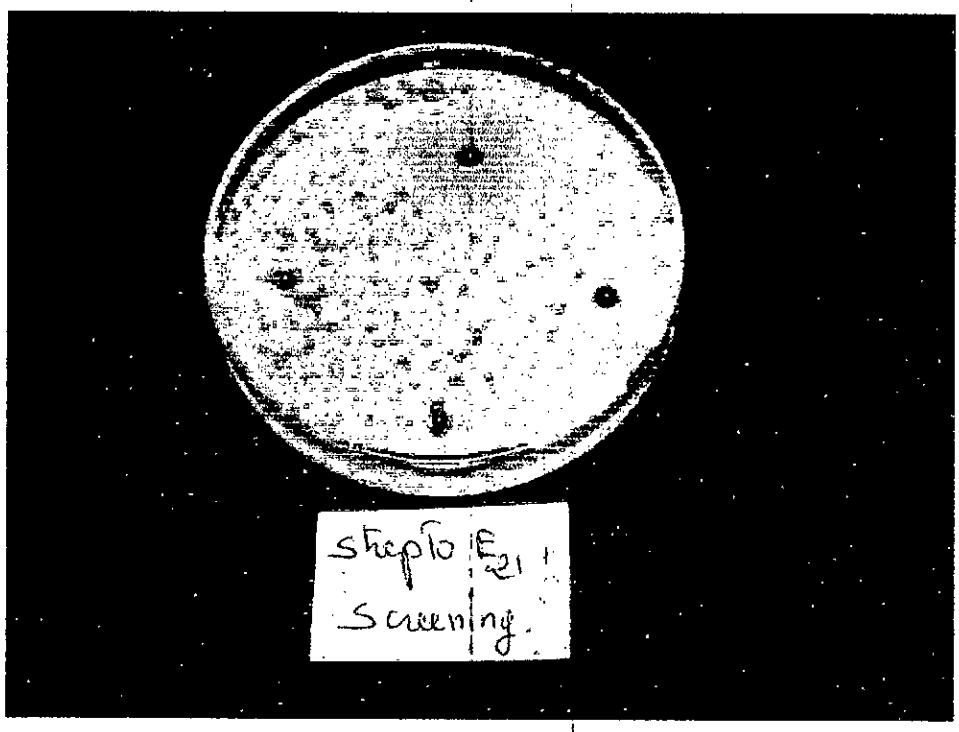
**2. tests antibactériens (méthode de diffusion en puits) :**



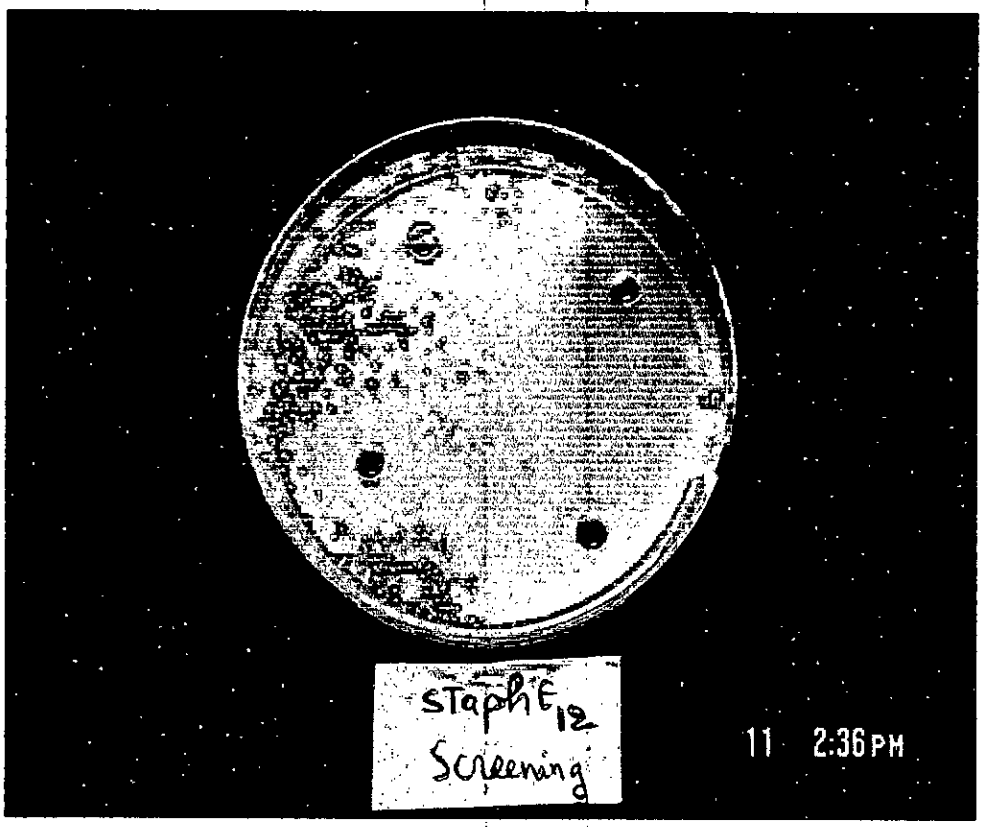

*E.coli* B3




*E.coli* B1




*Streptococcus* D2




*Staphylococcus aureus* C1

**Présenté par :** Boussouf lylia
**Rapporteur :** Dr Leghouchi Essaid

**Date de soutenance :** 04/11/2006.

# EFFET DES EXTRAITS DE CERTAINES PLANTES AROMATIQUES SUR LES GERMES PATHOGENES ISOLES A PARTIR DE PRODUITS PATHOLOGIQUES DES ANIMAUX DOMESTIQUES


## RESUME

Les huiles essentielles d'*Origanum vulgare, Achillea odorata, Lanvandula stoechas* et *Mentha pulegium* ont été obtenues par hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger. Leur pouvoir antimicrobien a été étudié in vitro par la méthode de diffusion en puits sur des souches microbiennes isolées à partir de produits pathologiques d'animaux domestiques.
Les huiles essentielles d'*Origanum vulgare* et *Achillea odorata* se sont révélées les plus actives, les deux autres ont montré une activité modérée surtout pour les souches Gram négatif.
Nous avons aussi montré que l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* en phase gazeuse a bien un effet antibactérien sur les bactéries testées.
D'autre part, l'effet scavenger des radicaux libres par les huiles essentielles a été évalué par la mesure de leur capacité à piéger le radical 1,1-diphényl -2- pycrilhydrazyl (DPPH). L'huile essentielle d'*Origanum vulgare* est l'huile qui a présenté le plus grand effet scavenger.
Les huiles essentielles ont été analysées par CPG/MS pour la détermination de leurs composés majoritaires.

**Mots clés** : Huiles essentielles, hydrodistillation, activité antimicrobienne, effet scavenger.



## Abstract

Essential oils from plant of *Origanum vulgare, Achillea odorata, Lavandula stoechas* and *Mentha pulegium* were obtained by destillation using a Clevenger. The in-vitro antimicrobial activity of these essential oils was evaluated by using agar well diffusion against microbs strains responsible for domestic animals infections and indicating that essential oil from *Origanum vulgare* and *Achillea odorata* are the most active, while the other two possess moderate activities mainly against the Gram négative strains.
We have also demonstrate that the tested essential oil gaseous phase from *Origanum vulgare* do have do antibacterial effet on all bacteria tested.
On the other hand, free radical scavenging capacity (RSC) of essential oils was assessed dy measuring the scavenging activity of extracts on the 1.1-diphenyl-2- pycrilhydrazyl (DPPH).The results showed that the essential oil of *Origanum vulgare* exhibited a very strong RSC.
The oils were analyzed by GC/MS thechnique in order to determine the majority compounds.

**Key-words** : Essentials oils, destillation, antimicrobial activity, free radical scavenging.



## ملخص

تم استخلاص الزيوت الطيارة لنباتا *Origanum vulgare*، *Achillea odorata*، *Lavandula stoechas* و *Mentha pulegium* بواسطة التقطير البخاري باستعمال جهاز Clevenger.
التأثير الميكروبي خارج حلوي لهذه الزيوت تم تقديره باستعمال طريقة الانتشار ضد سلالات ميكروبية معزولة من عينات مرضية لحيوانات أليفة.
بالمقارنة مع الزيوت الطيارة لـ *Origanum vulgare*، *Achillea odorata* و التي كانت أكثر فاعلية فإن مستخلصي النبتتين *Lanvandula stocchas*، *Mentha pulegium* أظهرا فاعلية أقل خاصة مع السلالات سالبة الجرام و قد تم إظهار أيضا أن الطور الغازي للزيت الطيار لنبتة *Origanum vulgare* يملك فعلا مضادا للبكتيريا المدروسة.
من جهة أخرى فإن التأثير الصياد الجذور الحرة و الذي تم تقديره بقياس القدرة الإرجاعية للجذر 1.1 -دي في نيل-2-بي كريل هيدرازيل (DPPH) قد اظهر أن الزيت الطيار لـ *Origanum vulgare* أبدى أكبر تأثير.
و بغرض تحديد المكونات الغالبية لمستخلصاتنا فقد قمنا بتحليلها بواسطة كروماطوغرافيا الطور الغازي و مطيافية الكتلة.

**الكلمات المفتاح:** الزيوت الطيارة، التقطير البخاري ، التأثير الميكروبي، التأثير الصياد.