



Année Universitaire : 2010-2011

Master Sciences et Techniques : CMBA
Chimie des Molécules Bio Actives



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES
Pour l'Obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

Titre :

**Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits des plantes
sur les souches bactériennes responsables des toxi-infections
alimentaires**

Présenté par:

HIMDI ABDESSELAM

Encadré par:

- Pr. A. EI OUALI LALAMI
- Pr. H. GRECHE
- Pr. F. ERRACHIDI
- Pr. A. BOULAHNA

Soutenu Le 23 Juin 2011 devant le jury composé de:

- Pr. F. ERRACHIDI (LRDEHM)
- Pr. H. GRECHE (INPMA)
- Pr. A. EI OUALI LALAMI (LRDEHM)
- Pr. A. BOULAHNA (FST-Fès)
- Pr. O. SQALLI (FST-Fès)
- Pr. A. OULMEKKI (FST-Fès)



Stage effectué au sein de l'Institut National des Plantes Médicinales et Aromatique (INPMA) et au Laboratoire Régionale de Diagnostic Epidémiologique et d'Hygiène du Milieu (LRDEHM).

Résumé

Le but de cette étude est l'évaluation de l'effet antibactérien de six plantes cultivées au Maroc vis-à-vis trois souches pathogènes responsables des toxi-infections alimentaires dans la région de Fès-Boulman. Cette étude a été réalisée en deux volets :

Le premier volet concerne l'extraction des huiles essentielles et leur caractérisation. Il a été effectué au sein du laboratoire de valorisation et application industrielle de l'institut National des plantes Médicinales et aromatique de TAOUNAT (INPMA).

L'extraction des huiles essentielles a été effectuée par hydrodistillation en utilisant un distillateur de type Clevenger ainsi les rendements obtenus varient dans notre gamme de 0,5 pour *Thymus vulgaris* à 1,66 pour *Origanum Vulgaris*. L'identification de la composition chimique de ces huiles essentielles a été réalisée par chromatographie sur phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. La composition chimique de ces huiles essentielles est différente et ceci est dû aux voies métaboliques propres à chaque végétal et à la différence de leurs espèces.

Le deuxième volet concerne la détermination de l'activité antibactérienne des huiles essentielles par des tests de sensibilité et a été effectué au sein du laboratoire Régionale de Diagnostic Epidémiologique et d'Hygiène du Milieu (LRDEHM).

Ce deuxième volet s'est heurté initialement à des difficultés d'évaluations de l'activité antibactérienne des huiles essentielles. Pour remédier à cette situation nous avons fait appel à des améliorations techniques et méthodologiques.

L'aspect méthodologique a ciblé les agents de dispersion « l'agar, l'éthanol et le Tween 20 » avec l'étude de leurs effets unique sur les souches bactérienne responsables des toxi-infections alimentaires et à notre surprise nous avons réalisé que l'agar est un agent inhibiteur de la croissance et que l'éthanol et le tween 20 sont des activateurs de la croissance bactérienne. L'aspect méthodologique a touché aussi l'étude de l'interaction entre l'agar et les huiles essentielles par la méthode des plans d'expériences. Ainsi on obtient des fonctions de réponses différentes ce qui veut dire que le modèle mathématique de croissance exprimé avec l'effet de l'agar, des huiles essentielles et leur interaction est une fonction qui dépend de la concentration de l'agar, de la nature chimique des HE et leurs constituants.

L'aspect Technique a ciblé l'amélioration de la technique de diffusion par création de disques à base d'agar imprégnés d'huile essentielle et contenant des volumes variables et maîtrisés, ainsi avec des disques contenant 1,5 µl d'HE on remarque que certaines HE sont caractérisées par un large spectre d'action et d'autres huiles essentielles représentent une spécificité envers des souches bien précises.

Mots clés: Toxi-infection Alimentaire - Antibiotique-Résistance -Huile essentielle -Activité antibactérienne - Agent de dispersion -Plans d'expériences -Disques d'agar



Sommaire

Introduction Générale	1
Chapitre 1: Bibliographie	
I- Toxi-infection Alimentaire :.....	2
I-1.Situation épidémiologique dans le monde :	2
I-2.Situation épidémiologique au Maroc :	3
I-3.Symptômes, causes, diagnostics et traitements :.....	3
I-2-a. Symptômes :.....	3
I-3-b. Causes :	4
I-3-c. Diagnostics :	4
I-3-d. Traitements :	5
II- Bactérie :	5
II-1.Définition :	5
II-2.Taxonomie bactérienne:	6
II-3.Structure cellulaire :	6
II-4. Croissance et reproduction :	7
II-4-a.Division cellulaire :.....	7
II-4-b. Culture et croissance des bactéries :	7
II-4-c. Paramètres influant sur la croissance bactérienne :.....	8
II-5. Mutation bactérienne :.....	9
II-5-a- Différents types de mutation :.....	9
a-1.Mutation ponctuelle:.....	9
a-2. Mutations par délétion ou insertion ou inversion des séquences :.....	9
III- Antibiotique :	10
III-1. Définition :	10
III-2. Mode d'action des antibiotiques :	10
III-3. Classification des Antibiotiques :.....	10
III-a-1. LES BETA LACTAMINE :	10
III-a-2. LES AMINOSIDES OU AMINOGLYCOSIDES :	11
III-a-3. LES PHENICOLES :.....	11
III-a-4. LES TETRACYCLINES :.....	11
III-a-5. LES POLYMYXINES :	11
III-a-6. LES MACROLIDES :	11
III-a-7. LES IINCOSANIDES :	11
III-a-8. LES SYNERGISTINES :	11
III-a-9. LES QUINOLONES :	11



III-a-10. LES NITROFURANES :	11
III-a-11. LES CINQ NITROIMIDAZOLES :	11
III-a-12. LES ACIDES SULFIRIQUES :	11
III-a-13. LES NOVOBIOCINES :	12
III-a-14. LES RIFAMYCINES :	12
IV-Résistance bactérienne aux antibiotiques :	12
IV-1. TYPES DE RÉSISTANCE :	12
IV-1-a.Résistance intrinsèque :	12
IV-1.b.Résistance acquise :	12
IV-2. Mécanismes de la résistance :	12
V-Plantes Médicinales et Aromatiques (PAM):	13
V-1. Introduction :	14
V-1.Huiles Essentielle :	13
V-2-a. Définition :	13
V-2-b. Historique d'utilisation des huiles essentielles :	13
V-3. Composition chimique des huiles essentielles :	14
V-4. Activité antibactérienne :	15
V-5. Mécanisme d'action :	15
V-6. Propriétés physico-chimique des huiles essentielles :	15
V-7. Domaine d'utilisation des huiles essentielles :	16
V-7-a. Aromathérapie :	16
V-7-b. Utilisations sanitaires :	196
V-7-c. Utilisations industrielles :	16
V-8. Extraction des huiles essentielles :	17
V-8-a. Hydrodistillation :	17
V-8-b. Entraînement à la vapeur d'eau :	17
V-8-c.Hydrodiffusion :	17
V-8-d. Distillation sèche :	18
V-8-e. Expression à froid :	18
V-8-f. Autres méthodes d'extraction :	18
V-9.Identification des huiles essentielles :	18
V-9-a. CPG-SM :	19
V-9-b. Chromatographie liquide sur colonne-CPG-SM :	19
V-10.Aperçu sur les techniques d'étude du pouvoir antibactérien des HE :	19
V-10-a. Techniques en milieu solide : Méthode de diffusion	20
a-1. Méthode des disques :	20
a-2. Méthode des puits :	20
a-3. Méthode de microatmosphère :	20



V-10-b. Technique en milieu liquide : Méthode de dilution	21
b-1. Méthode des disques de Sarbach :	21
b-2. Détermination de la CMI et CMB :	21

Chapitre 2: Matériels et Méthodes

I-Lieu et période de l'étude :	22
II- Matériel végétal :	22
II-1. Choix des plantes :	22
II-2. Récolte des plantes et extraction des huiles essentielles :	23
II-2-a. Récolte des plantes :	23
II-2-b. Détermination du Taux d'humidité :	23
II-2-c. Extraction des huiles essentielles :	23
II-3. Analyse de la composition chimique des huiles essentielles :	24
II-3-a. Conditions expérimentales	25
III- Matériel Biologique :	26
III-1. Choix des souches bactériennes :	26
III-2. Conservation et culture des bactéries :	26
III-2-a. Conservation :	26
III-2-b. Culture bactérienne en milieu solide :	27
III-2-c. Culture bactérienne en milieu liquide (la préculture):	28
IV-Etude de l'effet des huiles essentielles :	28
IV-1. Etude de l'effet des huiles essentielles en milieu liquide :	29
IV-1-a. Etude de la cinétique de croissance des bactéries en fonction des agents de dispersion :	29
a-1. Mode opératoire	29
IV-1-b. Evaluation de l'effet des huiles essentielles et de l'agar par la méthode des plans d'expériences :	31
b-1. Introduction:	31
b-2. PLAN D'EXPERIENCES	31
b-3. Mode opératoire	35
IV-2. Etude de l'effet des huiles essentielles en milieu solide : La méthode des disques d'agar.	36

Chapitre 3: Résultats et Discussions

I-Matériel végétal :	38
I-1. Identification des plantes :	38



I-2. Taux d'humidité :	40
I-3. Extraction des huiles essentielles :	41
I-4. Composition chimique des huiles essentielles :	41
I-4-a. Composition chimique de l'huile essentielle d' <i>Ammi visnaga</i> :	41
I-4-b. Composition chimique de l'huile essentielle du <i>Thymus satureioides</i> :	42
I-4-c. Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus Officinalis</i> :	43
I-4-d. Composition chimique de l'huile essentielle du <i>Thymus Vulgaris</i> :	44
I-4-e. Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Cymbopogon citratus</i> :	44
I-4-f. Composition chimique de l'huile essentielle de l'Origanum vulgar.	45
II-Matériel biologique :	46
III-Effet des huiles essentielles sur la croissance bactérienne :	47
III-1. Etude de l'effet des huiles essentielles en milieu liquide :	47
III-1.a. Cinétiques de la croissance bactérienne par rapport aux agents de dispersion :	48
a-1. Cinétique de croissance de la souche <i>Escherichia Coli</i> :	48
a-2. Cinétique de croissance de la souche <i>salmonella</i> :	50
a-3. Cinétique de croissance de la souche <i>Staphylococcus Aureus</i> :	52
a-4. Conclusion des cinétiques de croissance :	54
III-1-b. étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles par la méthode des plans d'expérience:	55
b-1. Evaluation de l'effet des huiles essentielles et de l'agar sur <i>Escherichia Coli</i> :	55
b-1-1. Effet de l'agar et de l'huile essentielle de la plante <i>Thymus Vulgaris</i> sur la souche <i>Escherichia Coli</i> : plan d'expérience 1	55
b-1-2. Effet de l'agar et de l'huile essentielle de la plante <i>Origanum Vulgar</i> sur la souche <i>Escherichia Coli</i> : plan d'expérience 2	56
b-1-3. Effet de l'agar et de l'huile essentielle de la plante <i>Cymbopogon Citratus</i> sur la souche <i>Escherichia Coli</i> : Plan d'expérience 3	57
b-1-4. Effet de l'agar et de l'huile essentielle de la plante <i>Rosmarinus officinalis</i> sur la souche <i>Escherichia Coli</i> : plan d'expérience 4	57
b-1-5. Effet de l'agar et de l'huile essentielle de la plante <i>Thymus Saturéioïdis</i> sur la souche <i>Escherichia Coli</i> : Plan d'expérience 5	58
b-1-6. Conclusion sur les plans d'expérience d'E. Coli vis-à-vis des HE	58
b-2. Evaluation de l'effet des huiles essentielles et de l'agar sur <i>Salmonella Sp</i> :	60
b-2-1. Effet de l'agar et de l'huile essentielle de la plante <i>Thymus Vulgaris</i> sur la souche <i>Salmonella Sp</i> :	60
b-2-2. Effet de l'agar et de l'huile essentielle de la plante <i>Rosmarinus Officinalis</i> sur la souche <i>Salmonella sp</i> : plan d'expérience 7	61
b-2-3. Effet de l'agar et de l'huile essentielle de la plante <i>Thymus Saturéioïdis</i> sur la souche <i>Salmonella Sp</i> :	61
b-2-4. Conclusion sur les plans d'expériences de salmonella Sp vis-à-vis les HE	62
b-3. Evaluation de l'effet des huiles essentielles et de l'agar sur <i>Staphylococcus Aureus</i> :	63



b-3-1. Effet de l'agar et de l'huile essentielle de la plante <i>thymus vulgaris</i> sur la souche <i>Staphylococcus Aureus</i> :	63
b-3-2. Effet de l'agar et de l'huile essentielle de la plante <i>Rosmarinus Officinalis</i> sur la souche <i>Staphylococcus Aureus</i> :	64
b-3-3. Effet de l'agar et l'huile essentielle de la plante <i>Thymus Saturéioïdis</i> sur la souche <i>Staphylococcus Aureus</i> :	65
b-3-4. Conclusion sur les plans d'expériences de <i>Staphylococcus aureus</i> vis-à-vis les HE :	65
III-2. Etude de l'effet des huiles essentielles en milieu solide :Méthode des disques d'agar: .	65
Conclusion générale :	68
Recommandations et perspectives :	68
Bibliographie :	69



Introduction Générale

Nous sommes plusieurs milliers de personnes à souffrir chaque année dans le monde d'intoxications alimentaires. L'alimentation est devenue un véritable sujet de préoccupation pour les citoyens.

Les intoxications alimentaires résultent de l'ingestion d'aliments contaminés par un microorganisme nocif ou un agent pathogène. Les microorganismes pouvant causer des toxi-infections alimentaires sont les virus, les parasites et les bactéries. Les bactéries sont le plus souvent mises en cause dans les cas d'intoxications alimentaires (1).

Au Maroc la plupart du temps, l'intoxication alimentaire est provoquée par la consommation de produits alimentaires contenant des toxines libérées par la croissance des bactéries.

Des études pratiques et statistiques, menées au laboratoire Régional de Diagnostic Epidémiologique et d'Hygiène de Milieu de la Direction Régionale de la Santé à Fès, ont montré que les bactéries du genre salmonelle, staphylocoque, Escherichia sont les principaux agents pathogènes responsables d'intoxications alimentaires.

On observe de plus en plus de préoccupations du fait que les bactéries, ont trouvé une parade pour lutter contre leur agresseur « l'antibiotique » en développant une résistance. Et ce qui est inquiétant, avec c'est qu'au début ce médicament était actif et efficace pour détruire des bactéries, puis au fil des années cet antibiotique n'a plus ou beaucoup moins d'effet. Ce qui constitue une menace réelle.

Les chercheurs et scientifiques tentent d'ores et déjà de trouver des alternatives efficaces et accessibles à partir de produits naturels extraits de plantes médicinales et aromatiques qui connaissent de nos jours un regain d'intérêt et jouissent d'une popularité grandissante. Les huiles essentielles font partie de cette gamme mais leur usage se heurte toujours aux problèmes méthodologiques d'évaluation de leur activité antibactérienne principalement liés à la complexité de leur composition et de leur insolubilité dans les milieux aqueux.

C'est dans ce cadre que s'inscrit notre sujet de recherche qui a pour objectif l'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles sur des germes responsables des toxi-infections alimentaires.

I- Toxi-infection Alimentaire :

L'intoxication alimentaire est une maladie courante généralement bénigne mais qui, parfois, peut être mortelle. Elle se produit lorsqu'une personne absorbe un aliment ou une boisson contaminée par une bactérie ou une toxine.

L'intoxication alimentaire peut affecter une personne (**TIA**), ou bien un groupe de personnes ayant mangé le même aliment contaminé (**TIAC : Toxi-infections Alimentaires Collective**). La plupart des intoxications alimentaires sont dues à des toxines produites par les bactéries ou par la quantité de bactéries elle-même.

Certaines bactéries peuvent se développer d'une à plusieurs millions dans les bonnes conditions d'humidité, de terrain alimentaire, de chaleur et de temps. Plus il y a de bactéries présentes, plus il y a de risques de contracter une infection ou une maladie. Les types de bactéries infectieuses les plus courantes sont le Campylobacter, l'E. Coli et la salmonelle (1).



Ces microorganismes constituent un problème croissant pour la santé publique. Dans de nombreux pays, on a signalé ces dernières décennies des augmentations significatives de l'incidence des maladies provoquées par des micro-organismes transmis principalement par les aliments (2).

Les risques chimiques restent une source importante de maladies d'origine alimentaire. Parmi les contaminants chimiques présents dans les aliments, on peut mentionner les toxiques naturels, comme les mycotoxines et les toxines d'origine marine, les contaminants environnementaux, comme le mercure et le plomb, et les substances naturellement présentes dans les plantes. Les additifs alimentaires, les micronutriments, les pesticides et les médicaments vétérinaires sont délibérément utilisés dans la chaîne alimentaire. Il faut toutefois d'abord s'assurer que toutes ces utilisations sont sans danger (1).

I-1.Situation épidémiologique dans le monde :

Il est difficile d'estimer l'incidence mondiale des maladies d'origine alimentaire, mais il a été signalé que l'année 2000, environ 2,1 millions de personnes sont mortes de maladies diarrhéiques. Même dans les pays industrialisés, jusqu'à 30% de la souffre de maladies d'origine alimentaire chaque année. Aux États-Unis, environ 76 millions de cas de maladies d'origine alimentaire, qui a abouti à 325.000 hospitalisations et 5.000 décès, on estime à chaque année. Les pays en développement en particulier sont les plus touchés par les maladies d'origine alimentaire en raison de la présence d'un large éventail de maladies, y compris celles causées par des parasites.

Les maladies d'origine alimentaire peuvent causer un préjudice grave et vaste sur la société. En 1994, une épidémie de salmonellose provenant de crèmes glacées contaminées aux Etats-Unis, affectant une 224.000 personne environ. En 1988, une épidémie d'hépatite A, résultant de la consommation de clams contaminés, touchée quelque 300.000 personnes en Chine.

La contamination des aliments crée une énorme pression sociale et économique sur les sociétés. Aux États-Unis, les maladies causées par les principaux agents pathogènes sont estimées à coûter jusqu'à 35 milliards \$ US par an (1997) en frais médicaux et la perte de productivité.

I-2.Situation épidémiologique au Maroc :

Une augmentation progressive au cours des dix dernières années a été constatée. En effet le nombre de cas et des épisodes de TIA et de TIAC de 1996 à 2001 a doublé. Les TIAC représentent, au Maroc, 11% des intoxications. Plus de 90% des TIAC sont d'origine bactérienne confirmée ou probable. Environ 7% des cas sont d'origine chimique: Contamination des aliments par des pesticides surtout. Prés de 1% des cas: TIAC d'origine végétale. Le reste étant d'origine indéterminée (1,5%) (2).

La contamination des aliments peut provenir des matières premières ou des préparateurs. L'eau d'alimentation peut aussi être à l'origine des TIA et des TIAC. Les TIA et les TIAC sont sous-déclarées au Maroc comme dans autant de pays du monde. Vu que la population marocaine ne connaît pas les risques des TIA et des TIAC, celles-ci ne sont déclarées qu'en face d'aggravation. Ainsi on peut estimer 10 cas pour chaque déclaration (3).

En 2006 une chute remarquable est relevée. Ceci peut être lié à l'éducation sanitaire, l'information, la communication en matière d'hygiène alimentaire et la prise de conscience du citoyen. La restauration collective nécessiterait un suivi régulier et en particulier les foyers ayant présenté des TIAC antérieurement (3).



I-3. Symptômes, causes, diagnostic et traitements :

I-2-a. Symptômes :

Les périodes d'incubation sont différentes pour chaque sorte d'intoxication alimentaire. Certaines causes produisent des symptômes en l'espace de 30 minutes ou de quelques heures, mais la plupart des cas d'intoxications alimentaires produisent des symptômes au bout de 12 à 48 heures. D'autres types ne se manifestent qu'au bout de quelques jours, voire une semaine (4).

Généralement, une intoxication alimentaire dure 1 à 3 jours mais peut se poursuivre pendant une semaine selon le type de bactérie, la gravité de l'infection et votre état de santé général. La plupart des personnes guérissent entièrement en l'espace d'une semaine.

Les symptômes les plus courants sont les vomissements, les douleurs abdominales, ainsi que la diarrhée due à l'inflammation du tractus gastro-intestinal (estomac et intestin).

Suivant la cause, les symptômes peuvent également inclure de la fièvre et des frissons, des selles contenant du sang, de la déshydratation, des douleurs musculaires, de la faiblesse et de l'épuisement.

Dans de très rares cas, une intoxication alimentaire grave peut endommager le système nerveux. Dans des cas extrêmes, elle peut même causer la paralysie ou **la mort**.

I-3-b. Causes :

Vous pouvez être victimes d'une intoxication alimentaire en absorbant des aliments qui ne sont pas correctement cuits, ou qui ont été contaminés par une personne qui ne les a pas lavés ou ne s'est pas lavé les mains avant de les manipuler.

Les bactéries causent une intoxication alimentaire soit par leur nombre, soit, plus couramment, en raison des toxines qu'elles produisent. Certaines bactéries produisent des toxines lorsqu'elles se multiplient et, dans de nombreux cas, ce sont ces toxines qui vous rendent malade, parfois un bon moment après que vous avez absorbé ces aliments contaminés.

La cause bactérienne la plus courante de l'intoxication alimentaire est le *Campylobacter*, qui se trouve dans la volaille crue, le lait cru, la viande rouge et l'eau non traitée. La salmonelle est la deuxième bactérie d'intoxication alimentaire la plus courante, elle se trouve dans le lait cru, les œufs et les produits à base d'œufs crus, la viande crue et la volaille (4).

Tous les cas d'intoxication alimentaire doivent être signalés aux autorités locales par votre médecin.

I-3-c. Diagnostics :

Si vous êtes hospitalisé(e), un médecin vous examinera physiquement, en prenant votre tension, votre pouls, votre vitesse de respiration et votre température. Votre niveau de déshydratation sera évalué et votre région abdominale pourra être examinée.

Le diagnostic est plus facile si plusieurs personnes ont pris les mêmes aliments ou boissons et présentent les mêmes symptômes.

Un échantillon de vomi pourra vous être demandé et examiné afin de rechercher les traces éventuelles de sang ou de mucus. Il sera envoyé à un laboratoire afin d'être analysé, pour connaître la cause exacte de l'intoxication alimentaire.

Un échantillon d'urine peut également être demandé pour essayer d'y détecter l'infection.



I-3-d. Traitements :

La plupart des cas d'intoxication alimentaire disparaissent au bout de quelques jours, sans que vous ayez à consulter un médecin. Cependant, si la maladie dure plus de quelques jours, s'il y a du sang, s'il y a du mucus jaune ou vert dans les selles, ou si vous êtes enceinte, vous devez obtenir un avis médical. Vous devez également consulter un médecin si la personne infectée est très âgée ou s'il s'agit d'un bébé.

Parfois, vous recevrez des Antibiotiques pour certains types d'infections bactériennes. La période de guérison dépend du type d'infection, de votre âge, de votre état de santé et de vos autres problèmes médicaux éventuels.

Ne mangez pas d'autres aliments tant que vous vous sentez nauséux/se ou que vous vomissez. Laissez votre estomac se reposer pendant une heure après avoir vomi, puis essayez de boire quelques gorgées d'eau. Veillez à boire de l'eau régulièrement ou utilisez les poudres de réhydratation disponibles en pharmacie.

Maintenez une bonne hygiène personnelle pour éviter de transmettre la maladie à d'autres personnes (4).

II-Bactérie :

II-1.Définition :

Une bactérie, ou bacteria, est un organisme vivant unicellulaire procaryote (caractérisé par une absence de noyau et d'organite). La plupart des bactéries possèdent une paroi cellulaire glucidique, le peptidoglycane. Les bactéries présentent de nombreuses formes : sphériques (coques), allongées ou en bâtonnets (bacilles), des formes plus ou moins spiralées. L'étude des bactéries est la bactériologie, une branche de la microbiologie (5).

II-2. Taxonomie bactérienne:

La taxonomie est la science qui en Biologie étudie la classification des êtres vivants. Ce besoin de classification provient du fait que tous les organismes vivant actuellement et aussi ceux dont l'espèce est éteinte, proviennent d'organismes ancestraux, par le mécanisme complexe de l'évolution des espèces (6).

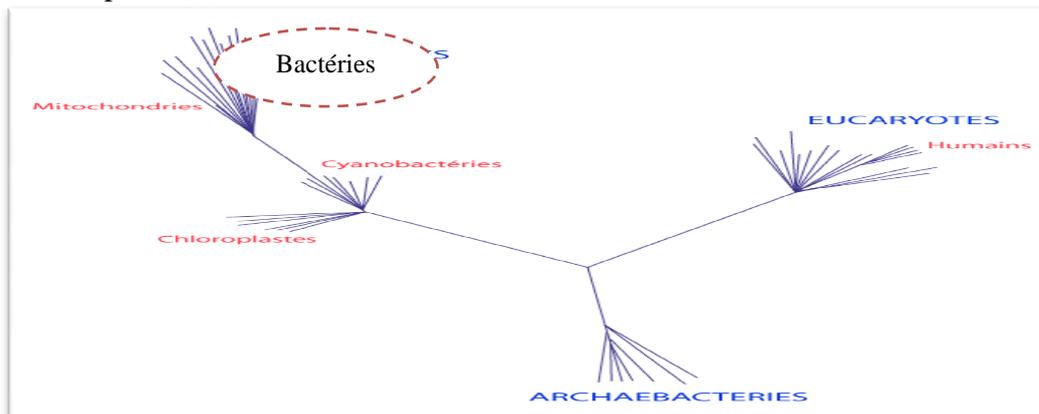


Figure 1 : Classification des bactéries

II-3.Structure cellulaire :

En tant que procaryote les bactéries sont des cellules relativement simples, caractérisées par une absence de noyau et d'organites comme les mitochondries et les chloroplastes, elles n'ont pas non plus de réticulum endoplasmique ou d'appareil de golgi (7).

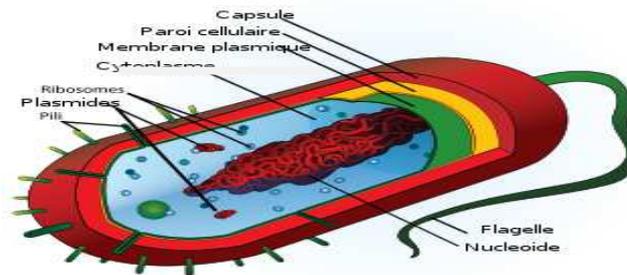


Figure 2 : Structure cellulaire d'une bactérie

Une caractéristique importante des bactéries est la paroi cellulaire. Les bactéries peuvent être divisées en deux groupes (**Gram négatif et Gram positif**) basé sur la différence de la structure et de la composition chimique de la paroi cellulaire mise en évidence grâce à la coloration de Gram. Les bactéries à coloration de Gram positif possèdent une paroi cellulaire contenant un peptidoglycane épais et des acides teichoïques alors que les bactéries à coloration de Gram négatif présentent un peptidoglycane fin localisé dans le périplasma entre la membrane cytoplasmique et une membrane cellulaire externe. La paroi donne à la bactérie sa forme et la protège contre l'éclatement sous l'effet de la très forte pression osmotique. Le peptidoglycane assure la rigidité de la paroi. Il existe toutefois des bactéries sans paroi : ce sont les mycoplasmes (7) ; (8).

II-4. Croissance et reproduction :

II-4-a. Division cellulaire :

Deux cellules identiques sont produites à partir d'une cellule mère. La croissance cellulaire se manifeste par un accroissement du volume cellulaire, suivi de la synthèse d'un septum transversal au milieu de la cellule, aboutissant à la séparation des deux cellules filles. La division bactérienne est précédée par la duplication du chromosome bactérien grâce à la réplication de l'ADN (9). Quand elles se trouvent dans un milieu propice les bactéries peuvent se multiplier à une allure vertigineuse. Une population de bactéries peut doubler toutes les 20 minutes en fonction de : la disponibilité en nutriments, la présence de bactéries concurrentes, la présence de prédateurs (par exemple des paramécies), la présence d'antibiotiques (inhibant par exemple la synthèse de la paroi bactérienne, entraînant donc leur mort) produits par des champignons ou des actinomycètes (bactéries filamenteuses).

II-4-b. Culture et croissance des bactéries :

Au laboratoire, les bactéries peuvent être cultivées en milieu de culture liquide ou en milieu solide. Le milieu de culture doit apporter les éléments nutritifs ou nutriments élémentaires à la bactérie. Les milieux de culture gélosés solides sont utilisés pour isoler des cultures pures de cellules bactériennes. Dans le cas des bactéries se divisant rapidement, une cellule bactérienne dispersée sur un milieu gélosé va se multiplier et, au bout de 24 à 48 heures, elle va devenir un amas de bactéries, appelé une colonie bactérienne, visible à l'œil nu.

Le temps de génération est le temps nécessaire à une bactérie pour se diviser. Le temps de génération correspond donc au temps nécessaire pour qu'une population de cellules double en nombre. Ce temps est très variable selon les espèces de bactéries et les conditions environnementales.

La croissance d'une population bactérienne dans un milieu de culture liquide peut être observée dans le temps. Les cellules se divisent, leur nombre augmente avec le temps et le milieu devient trouble.



Figure 3 : Culture bactérienne en milieu solide et liquide

Si on relève le nombre de bactéries à différents intervalles au cours de la croissance, on obtient une courbe de croissance. Elle présente quatre phases principales (10):

- La phase de latence correspond à une période d'adaptation de la bactérie au milieu ;
- Au cours de la phase de croissance exponentielle, les bactéries se développent de façon maximale avec **un taux de croissance maximal et constant** ;
- Après une phase transitoire de ralentissement, le nombre de bactéries n'évolue plus : c'est la phase stationnaire. Les divisions bactériennes qui se font encore sont compensées par la mort de bactéries ;
- La dernière phase est la phase de mortalité ou de déclin. Les bactéries ne se divisent plus, elles meurent et peuvent être lysées. Le milieu de culture n'apporte plus les conditions nécessaires au développement des bactéries.

II-4-c. Paramètres influant sur la croissance bactérienne :

Certaines conditions environnementales (paramètres physico-chimiques) influencent la croissance des micro-organismes. Parmi celles-ci figurent le pH (acidité et alcalinité), la température, la présence d'O₂, de CO₂, la disponibilité de l'eau.

La plupart des micro-organismes tolèrent une gamme de pH permettant la croissance. Le pH optimal de croissance de beaucoup de bactéries est proche de la neutralité (pH=7). Les micro-organismes acidophiles se développent à des pH acides, alors que les micro-organismes alcalinophiles se développent à des pH basiques.

De même, les bactéries peuvent être distinguées selon leur aptitude à croître en fonction de la température. Les mésophiles se développent généralement à des températures comprises entre 20 et 45 °C. Les psychrophiles possèdent des températures optimales de croissance inférieures à 15 °C, alors que les bactéries thermophiles croissent de façon optimale à des températures comprises entre 45 et 70 °C. Les micro-organismes ayant des températures optimales de croissance supérieures à 70 °C sont qualifiés d'hyperthermophiles.

II-5. Mutation bactérienne :

Une mutation est une modification brusque, rare, aléatoire et héréditaire du génome bactérien. Toute modification de la séquence nucléotidique d'un gène constitue une mutation. Ces modifications sont liées à la substitution d'une base, à la délétion ou à l'addition d'une base à la perte ou à l'addition ou à l'inversion de séquences d'ADN (11).



II-5-a- Différents types de mutation :

a-1. Mutation ponctuelle :

La substitution d'une base ainsi que la délétion ou l'addition d'une base conduisent à des mutations ponctuelles.

Substitution : On parle de transition lorsqu'une base purique est remplacée par une autre base purique ou lorsqu'une base pyrimidique est remplacée par une autre base pyrimidique et on parle de transversion si une base purique est remplacée par une base pyrimidique ou vice versa. La substitution conduit à des mutations silencieuses ou à des mutations faux sens ou à des mutations non-sens :

La mutation est silencieuse si la substitution ne modifie pas la nature de l'acide aminé. Par exemple, si le codon UUC est modifié en un codon UUU, la mutation sera silencieuse car ces deux codons codent pour la phénylalanine.

Lors d'une mutation faux sens, un acide aminé d'une protéine est remplacé par un autre acide aminé. Par exemple, si le codon CUU est remplacé par le codon UUU, la phénylalanine remplacera la leucine dans le peptide synthétisé. Une mutation faux sens modifie le phénotype si l'acide aminé qui a été remplacé joue un rôle majeur dans le repliement de la protéine ou dans l'activité de la protéine. Cependant, de nombreuses mutations faux sens n'ont pas de répercussions phénotypiques car l'acide aminé modifié n'a qu'un rôle mineur dans l'activité de la protéine **(11)**.

Une mutation est qualifiée de non-sens lorsque la substitution provoque la formation d'un codon stop (UAG, UAA ou UGA). La protéine synthétisée sera alors une protéine tronquée.

Addition ou délétion d'une base : L'addition ou la délétion d'une seule paire de base modifie le cadre de lecture de l'ARNm et a des répercussions sur tous les codons situés en aval. De telles mutations ont généralement des répercussions phénotypiques.

a-2. Mutations par délétion ou insertion ou inversion des séquences :

Deux cassures de l'ADN peuvent survenir et conduire à la perte du segment d'ADN compris entre ces deux cassures. De telles mutations sont fréquemment létales.

Des séquences d'ADN peuvent être insérées ou dupliquées ou changées dans leur orientation. Si le nombre de paires de bases enlevées ou insérées est un multiple de trois le cadre de lecture n'est pas altéré, mais la protéine est allongée d'un ou de quelques acides aminés ce qui peut altérer sa fonction **(11)**.

III- Antibiotique :

III-1. Définition :

Un antibiotique est une substance antibactérienne d'origine biologique, c'est à dire produite par des micro-organismes (champignons microscopiques et bactéries) ou de synthèse chimique et qui est capable à une très faible concentration d'inhiber la multiplication ou détruire d'autres micro-organismes **(12)**.

Les antibiotiques sont définis par leur :

- ✚ activité antibactérienne (spectre d'activité) ;
- ✚ toxicité sélective (mode d'action) ;
- ✚ bonne absorption et diffusion dans l'organisme.

III-2. Mode d'action des antibiotiques :

Ils agissent à un niveau précis des structures bactériennes. Les principales cibles sont **(13)** ; **(14)** :



- ✚ la paroi bactérienne : inhibition de la synthèse de la paroi ;
- ✚ la membrane cytoplasmique ;
- ✚ l'ARN des ribosomes : inhibition de la synthèse des protéines ;
- ✚ l'ADN bactérien : inhibition de sa synthèse.

III-3. Classification des Antibiotiques :

Les antibiotiques peuvent être classés selon plusieurs critères: l'origine, la nature chimique, le mécanisme d'action et le spectre d'action. Selon le mécanisme d'action on distingue (12) (13) (14):

III-a-1. LES BETA LACTAMINES : Les β lactamines agissent au niveau de la paroi bactérienne en inhibant la dernière étape de la synthèse du peptidoglycane entraînant une lyse bactérienne.

III-a-2. LES AMINOSIDES OU AMINOGLYCOSIDES : Ils perturbent la synthèse des protéines au niveau de la fraction 30S du ribosome entraînant la destruction bactérienne.

III-a-3. LES PHENICOLES : Ils agissent au niveau de la sous unité 50 S du ribosome. Ceci a pour conséquence une inhibition de la synthèse des protéines.

III-a-4. LES TETRACYCLINES : Les tétracyclines inhibent la synthèse des protéines au niveau de la sous unité 30 S du ribosome.

III-a-5. LES POLYMYXINES : Ils agissent au niveau de la membrane cytoplasmique bactérienne entraînant l'éclatement de la bactérie.

III-a-6. LES MACROLIDES : Les macrolides agissent en inhibant la synthèse protéique bactérienne. Ils se fixent sur l'unité 50 S du ribosome et bloquent ainsi la réunion du dernier stade de la synthèse.

III-a-7. LES LINCOSANIDES : Les lincosanides agissent sur la fraction 50 S du ribosome en inhibant la phase initiale de la synthèse protéique.

III-a-8. LES SYNERGISTINES : Agissent sur la sous unité 50 S du ribosome en bloquant en deux étapes différentes la synthèse de la chaîne peptidique.

III-a-9. LES QUINOLONES : Les quinolones inhibent la synthèse de l'ADN de la bactérie en se fixant sur le complexe "ADN-ADN gyrase" en empêchant la réplication et transcription de l'ADN bactérien.

III-a-10. LES NITROFURANES : Les nitrofuranes agissent en perturbant la réplication de l'ADN.

III-a-11. LES CINQ NITROIMIDAZOLES : Ils agissent en inhibant la synthèse des acides nucléiques entraînant la mort rapide de la bactérie.

III-a-12. LES ACIDES SULFIRIQUES : agissent sur la synthèse des protéines.

III-a-13. LES NOVOBIOCINES : inhibent la réplication de l'ADN.

III-a-14. LES RIFAMYCINES : Les rifamycines agissent en bloquant la transcription par inhibition de l'ARN polymérase.

IV- Résistance bactérienne aux antibiotiques :

En réponse à la pression de sélection antibiotique, les bactéries ont développé, tant sur le plan biochimique que génétique, de nombreux mécanismes conférant la résistance à la bactérie hôte, ainsi que sa capacité de transmission à d'autres bactéries. Ces microorganismes combinent notamment des mécanismes à large spectre de substrats, qui leur permettent de résister simultanément à diverses classes d'antibiotiques et de devenir ainsi multirésistantes (15).



IV-1. TYPES DE RÉSISTANCE :

Il existe deux grands types de résistance aux antibiotiques (15):

IV-1-a. Résistance intrinsèque :

La résistance intrinsèque c'est une insensibilité aux antibiotiques, existant naturellement chez tous les membres d'un genre ou d'une espèce bactérienne. Elle fait, donc, partie du patrimoine génétique normal du germe.

IV-1.b. Résistance acquise :

C'est l'acquisition de nouveaux gènes capables de rendre la bactérie insensible à un antibiotique ou à un groupe d'antibiotiques. Ce nouveau gène peut être obtenu soit par mutation au niveau du chromosome qui est un phénomène rare soit par transfert d'ADN de plasmides conjugatifs ou de transposons (mécanisme le plus fréquent).

IV-2. Mécanismes de la résistance :

Les bactéries ont développé quatre grands mécanismes d'acquisition de la résistance (15) ; (16) :

- ✚ la modification de la cible, qui entraîne une perte d'affinité de l'antibiotique pour cette dernière ;
- ✚ la production d'une enzyme qui va détoxifier l'antibiotique ;
- ✚ l'imperméabilité, notamment par diminution du diamètre des porines (pores au niveau de la membrane externe) ;
- ✚ l'efflux des antibiotiques à l'extérieur de la cellule par des pompes énergie dépendantes.

Le motif commun à ces différents mécanismes de résistance est d'empêcher l'interaction de l'antibiotique avec sa cible.

V-Plantes Médicinales et Aromatiques (PAM):

V-1. Introduction :

Par ses contrastes géographiques, le Maroc offre une gamme variée de bioclimats permettant l'installation d'une flore riche (plus de 4200 espèces). A coté de ce contexte naturel prometteur, le Maroc dispose d'un savoir-faire ancestral : la médication par les plantes, leur utilisation pour l'aromatisation et la conservation des aliments, ainsi que pour l'extraction des principes aromatiques (17) ; (18).

La valorisation de ces ressources naturelles végétales passe essentiellement par l'extraction de leurs huiles essentielles. Ces dernières sont des produits à forte valeur ajoutée, utilisées dans les industries pharmaceutiques, cosmétiques et agroalimentaires. L'étude des activités biologiques et biotechnologiques des extraits de plantes est d'un grand intérêt. Les activités antimicrobiennes des huiles essentielles ont été rapportées dans plusieurs travaux (19) ; (20) ; (21).

V-2.Huiles Essentielles :

V-2-a. Définition :



Les HE sont des complexes naturels de molécules volatiles et odorantes extraits par entraînement à la vapeur d'eau ou par pression (cas des agrumes) (22).

V-2-b. Historique d'utilisation des huiles essentielles :

Les traces d'utilisation des huiles essentielles remontent à plus de 7000 ans (on trouve en - 40 000 les premières traces chez les aborigènes d'Australie avec la fumigation), preuve en est un alambic en terre cuite retrouvé au Pakistan datant de cette époque. On trouve des inscriptions datant de 4000 ans en Mésopotamie et des écrits égyptiens datant de 3500 ans. Les Égyptiens obtenaient des huiles essentielles en pressant des plantes. Les Romains utilisaient également les huiles essentielles. Mais la grande épopée des huiles essentielles débute au 15^{ème} siècle jusqu'en 1935, date à laquelle elle fut reléguée en arrière-plan avec la découverte de la pénicilline...

Durant la guerre de 1939-45, le Dr. Jean Valnet guérissait les blessures de guerre en utilisant des huiles essentielles. Les notions curatives des huiles essentielles furent vulgarisées par son premier livre: "L'aromathérapie, traitement des maladies par les essences des plantes" (publié en 1964).

V-3. Composition chimique des huiles essentielles :

La composition chimique d'une HE est assez complexe, on y trouve généralement de nombreux constituants appartenant principalement à deux grandes familles chimiques: les composés terpéniques et les composés aromatiques, dérivés du phénylpropane (23).

Les composés terpéniques sont formés d'unités isopréniques (en C5) et comprennent les monoterpènes (C10), les sesquiterpènes (C15), les diterpènes (C20) et les triterpènes (C30). Ces composés ont tous la même origine métabolique.

Les composés aromatiques dérivés du phénylpropane ont une biogenèse différente de celle des terpènes. On peut citer l'acide et l'aldéhyde cinnamique (HE de cannelle), l'eugénol (HE de girofle), le carvacrol (HE d'origan), l'anéthol et l'aldéhyde anisique (HE de badiane, d'anis et de fenouil) qui sont les principaux membres de cette famille (24).

Les acides organiques, les cétones de faible poids moléculaire et les coumarines volatiles entrent également en faible proportion dans la constitution des HE.

Cependant, cette complexité de la composition chimique des HE suscite plusieurs remarques (23):

- ✚ parmi les nombreux constituants d'une HE, l'un domine généralement, on l'appelle composé majoritaire ;
- ✚ à l'intérieur d'une même espèce végétale, on observe des variations chimiques (Qualitatives et quantitatives) importantes, ce qui conduit à admettre l'existence de 29 chémotypes chimiques (exemple: Thym à thymol, à géraniol, à carvacrol, à linalool, Etc.) ;
- ✚ La composition chimique des HE varie avec le milieu et l'époque de la végétation. Elle peut aussi se modifier au cours de l'extraction et durant la conservation.

V-4. Activité antibactérienne :

Les vertus antibactériennes des HE sont connues et utilisées depuis longtemps, mais cette utilisation se basait sur des pratiques traditionnelles et des applications sans bases scientifiques précises. De nos jours, leur emploi se fait sur des bases scientifiques et rationnelles puisque de nombreux travaux de recherche portent sur les propriétés antibactériennes des HE des plantes aromatiques (25) ; (26).



In vitro, l'effet microbicide de certaines HE a même été trouvé supérieur à celui des antibiotiques. De plus, elles ont un champ d'action très large. Plusieurs travaux montrent que les HE et leurs composés majoritaires ont un effet antimicrobien vis-à-vis des bactéries à Gram négatif et à Gram positif (27).

L'activité antimicrobienne des HE est principalement liée à leur composition chimique et en particulier à la nature de leurs composés majoritaires.

En effet, il est admis que l'activité antibactérienne des HE se classe dans l'ordre décroissant suivant la nature de leur composés majoritaires : Phénol > alcool > aldéhyde > cétone > oxyde > hydrocarbures > esters. L'effet des composés quantitativement minoritaires n'est parfois pas négligeable.

V-5. Mécanisme d'action :

L'activité antibactérienne des HE a fait l'objet d'un grand nombre de publications à l'échelle internationale. Cependant, la majorité des travaux cités dans ces publications s'arrêtent au niveau de la mise en évidence de l'activité antibactérienne de ces HE. Les études sur les mécanismes d'action de cette activité sont en nombre négligeable. Jusqu'à présent, il n'existe pas d'étude pouvant nous donner une idée claire et précise sur le mode d'action des HE. Etant donné la complexité de leur composition chimique, tout laisse à penser que ce mode d'action est assez complexe et difficile à cerner du point de vue moléculaire. Il est très probable que chacun des constituants des HE ait son propre mécanisme d'action. D'une manière générale, on estime que leur action se déroule en trois phases principales (28):

- ✚ attaque de la paroi bactérienne par l'huile essentielle, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires ;
- ✚ acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure ;
- ✚ destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie.

V-6. Propriétés physico-chimique des huiles essentielles :

On trouve généralement les HE incolores ou jaune pâle à l'état liquide à température ordinaire. Toutes les HE sont volatiles, odorantes et inflammables. Leur densité est le plus souvent inférieure à 1. Seules trois HE officinales ont une densité supérieure à celle de l'eau, ce sont les HE de *cannelle*, de *girofle* et de *sassafras*.

Elles sont peu solubles dans l'eau, solubles dans les alcools et dans la plupart des solvants organiques. Elles sont altérables et très sensibles à l'oxydation (22).

V-7. Domaine d'utilisation des huiles essentielles :

V-7-a. Aromathérapie :

L'aromathérapie est une branche de la phytothérapie qui utilise les HE pour traiter un certain nombre de maladies.

Le terme aromathérapie vient du chimiste Français René-Maurice Gattefosse, qui a utilisé l'HE de *lavande* pendant la première guerre mondiale pour soigner des blessures et des infections. Selon lui, la *lavande* était plus appropriée pour traiter les infections que plusieurs antiseptiques utilisés à cette époque. Cette spécialité préoccupe de plus en plus des médecins et des pharmaciens qui ont publié un nombre important d'ouvrages d'aromathérapie (29).



Les HE sont largement utilisés pour traiter certaines maladies internes et externes (infections d'origine bactérienne ou virale, troubles humoraux ou nerveux). L'huile de *Périlla* utilisée pour l'indigestion, les rhumes, la toux et dans toute autre maladie due à un refroidissement, pour les nausées et les vomissements, pour la malaria et même dans les cas de choléra (30).

V-7-b. Utilisations sanitaires :

Les HE sont utilisés en raison de leurs propriétés stimulantes ou inhibitrices notamment sur les microbes. Les HE servent par exemple comme produits phytosanitaires pour combattre dans les cultures végétales les infections fongiques ou bactériennes ou virales. Elles apportent des solutions en agriculture biologique, réduisant les effets néfastes des pesticides de synthèse.

V-7-c. Utilisations industrielles :

Les industries de la [parfumerie](#), des [arômes](#) et de la [cosmétique](#) sont les principales consommatrices d'huiles essentielles. Ce sont en effet les produits de base utilisés pour ajouter des [odeurs](#), en raison de leur forte volatilité et du fait qu'elles ne laissent pas de trace grasse. Dans de l'agro-alimentaire aussi on utilise des HE pour incorporer aux aliments des [saveurs](#). Le secteur des produits ménagers ([détergents](#) et [lessives](#) par exemple) consomme beaucoup d'huiles essentielles pour masquer les odeurs, souvent peu agréables, des produits purs (31).

V-8. Extraction des huiles essentielles :

Il existe plusieurs méthodes pour extraire les huiles essentielles. Les principales sont basées sur l'entraînement à la vapeur, l'expression, la solubilité et la volatilité. Le choix de la méthode la mieux adaptée se fait en fonction de la nature de la matière végétale à traiter, des caractéristiques physico-chimiques de l'essence à extraire, de l'usage de l'extrait.

V-8-a. Hydrodistillation :

Ce procédé consiste à immerger la matière première végétale dans un bain d'eau. L'ensemble est ensuite porté à ébullition. La chaleur permet l'éclatement et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales. La vapeur d'eau et les composés volatiles rentrent en contact avec une surface froide ce qui permet le passage à l'état liquide et les deux liquides de densité différentes sont ensuite séparés par simple décantation (32).

V-8-b. Entraînement à la vapeur d'eau :

A la différence de l'hydrodistillation, la distillation par entraînement à la vapeur d'eau ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale. De la vapeur d'eau fournie par une chaudière traverse la matière végétale située au dessus d'une grille. La température de la vapeur doit être parfaitement contrôlée. Durant le passage de la vapeur à travers le matériel végétal, les micro-poches du végétal se dilatent, puis éclatent, libérant ainsi les composés volatils qui sont entraînés par la vapeur d'eau. Ce mélange passe à l'état liquide par refroidissement. Le mélange est recueilli dans un réservoir, l'huile essentielle étant peu soluble dans l'eau se sépare très vite de celle-ci. L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile.



V-8-c. Hydrodiffusion :

Elle consiste à pulser de la vapeur d'eau à travers la masse végétale, du haut vers le bas. Ainsi le flux de vapeur traversant la biomasse végétale est descendant contrairement aux techniques classiques de distillation dont le flux de vapeur est ascendant. L'avantage de cette technique est traduit par l'amélioration qualitative et quantitative de l'huile récoltée, l'économie du temps, de vapeur et d'énergie (33).

V-8-d. Distillation sèche :

Elle consiste à chauffer d'une façon très modérée les plantes ou des parties de plantes sans ajout d'eau ni de solvants organiques, puis à condenser les substances volatiles. L'avantage de cette méthode est la température à laquelle se déroule l'extraction qui est inférieure à 100°C, ce qui évite la dénaturation de certaines molécules thermosensibles ; rares sont les documents se rapportant à la distillation sèche en tant que méthode d'extraction de composés aromatiques volatils. Il s'agit pourtant d'une méthode d'extraction des huiles essentielles caractéristiques des végétaux fragiles tels que les pétales de rose.

V-8-e. Expression à froid :

L'expression à froid est essentiellement utilisée pour l'extraction des composés volatiles contenus dans les micro-poches de surface des péricarpes des agrumes (*citron, orange, mandarines, pamplemousses*). Il s'agit d'un traitement mécanique qui consiste à déchirer les péricarpes riches en cellules sécrétrices. L'huile essentielle libérée est recueillie par un courant d'eau.

V-8-f. Autres méthodes d'extraction :

D'autres procédés d'extraction tels que l'enfleurage et l'extraction par solvants organiques sont utilisés par certains auteurs (34). L'enfleurage est ancien procédé d'extraction pratiquement abandonné. Il consiste en la macération des plantes ou parties de plantes, dont l'arôme est trop fragile pour supporter la chaleur d'une distillation, dans des graisses ou des huiles.

La technique d'extraction par solvant, consiste à placer dans un extracteur la matière végétale et un solvant volatil. Les solvants les plus employés sont : l'éther de pétrole, le méthanol, l'éthanol ou l'hexane.

L'extraction au dioxyde de carbone supercritique élimine le problème des résidus de solvants et permet l'usage de température plus faibles ce qui réduit la détérioration des composés thermolabiles. En effet, le dioxyde de carbone soumis à une haute pression, est converti à l'état supercritique. C'est une phase aussi dense qu'un liquide mais assurant des propriétés de transport proche d'un gaz. Il est ainsi utilisé comme solvant pour extraire les molécules aromatiques (35).

V-9. Identification des huiles essentielles :

Une parfaite connaissance de la composition chimique des huiles essentielles est nécessaire aux industriels et pour les chercheurs pour en contrôler la qualité et la régularité en vue d'une bonne commercialisation et pour y déceler une éventuelle spécificité en vue de sa valorisation. En effet, ces huiles essentielles constituent souvent une matière première destinée à des secteurs d'activités aussi divers que ceux de la parfumerie, des cosmétiques, des industries pharmaceutiques et de l'agroalimentaire. Quel que soit le secteur concerné, l'analyse des huiles essentielles reste une étape importante qui, malgré les développements constants des méthodes de séparations et



d'identifications, demeure une opération délicate nécessitant la mise en œuvre de diverses techniques.

V-9-a. CPG-SM :

Cette technique consiste à analyser les huiles essentielles, tout d'abord, par Chromatographie en Phase gazeuse (CPG) ; cette technique chromatographique permet l'individualisation des constituants, leur quantification et le calcul de leurs indices de rétention (Ir), puis à les analyser par le couplage « en ligne » avec la spectrométrie de masse (SM). L'identification est ensuite réalisée par comparaison des indices de rétention Ir et des données spectrales (spectres de masse) des constituants individualisés avec les caractéristiques de produits de référence contenus dans des bibliothèques de spectres. Cette étape est habituellement suffisante dans les cas d'analyse de routine d'huiles essentielles. Cette technique est utilisée par plusieurs chercheurs (36) ; (37).

V-9-b. Chromatographie liquide sur colonne-CPG-SM :

Cette séquence est mise en œuvre lorsque l'huile essentielle est complexe lorsque l'analyse est réalisée dans une optique de recherche. Un fractionnement de l'huile essentielle est alors effectué, le plus souvent par chromatographie liquide sur colonne ouverte de silice ou d'alumine. Les fractions obtenues sont ensuite analysées de la façon décrite dans la première partie (CPG-SM). Cette étape est à privilégier lorsque l'on veut étudier les différentes familles de composés (esters, alcools, cétone...).

V-10. Aperçu sur les techniques d'étude du pouvoir antibactérien des HE :

La technique utilisée pour déterminer le pouvoir antibactérien des HE a une grande influence sur les résultats. Des difficultés pratiques viennent de l'insolubilité des constituants des HE dans l'eau, de leur volatilité et de la nécessité de les tester à faibles concentrations (Abdelghafour.T et all, 1997) (38). A l'heure actuelle, l'activité antibactérienne *in vitro* d'une substance peut être mise en évidence par un grand nombre de techniques classiques, aussi bien en milieu solide qu'en milieu liquide. Nous allons essayer d'énumérer ces différentes méthodes et de discuter chacune d'elle.

V-10-a. Techniques en milieu solide : Méthode de diffusion

a-1. Méthode des disques :

Elle est appelée aussi technique de l'aromatogramme .Dans cette méthode, on utilise des disques de papier filtre de (6, 7,8) mm de diamètre, imprégnés d'HE et déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé en surface à l'aide d'une suspension bactérienne. Après incubation, la lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre d'inhibition en mm. La dilution des HE se fait toujours dans un solvant tel que le tween 20, ou l'éthanol. Le principe de cette méthode est toujours la migration de l'HE par diffusion dans la gélose (27) ; (36) ; (39).

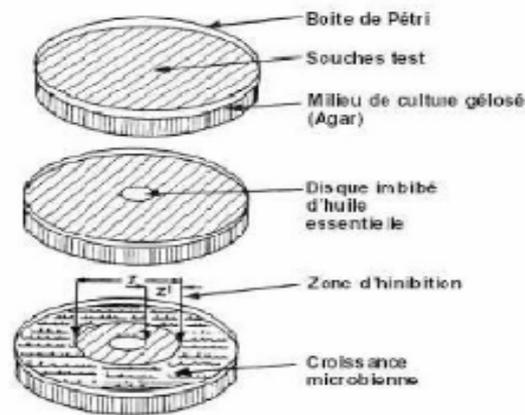


Figure 4 : Technique de l'aromatogramme

a-2. Méthode des puits :

Une variante de la technique des disques consiste en l'aménagement de dans la gélose coulée et solidifiée en boîte. On remplit cette cavité d'un volume donné d'HE qui va diffuser dans la gélose, et on procède, après incubation, à la mesure du diamètre d'inhibition comme dans la technique précédente (40).

a-3. Méthode des microatmosphères :

C'est une technique d'étude en phase vapeur. Son principe est d'ensemencer une boîte de Pétri avec les germes, tandis que l'on dépose quelques gouttes d'HE sur un papier filtre au fond et au centre du couvercle. La boîte est incubée couvercle en bas. Il se produit une évaporation des substances volatiles et on lit après incubation, la croissance des germes ou l'inhibition de leur croissance (39).

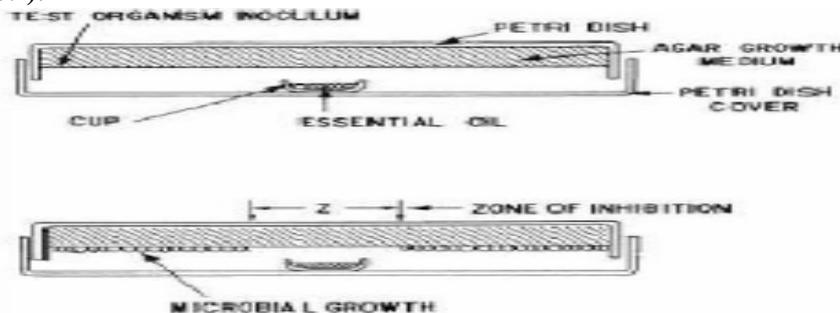


Figure 5 : Technique des microatmosphères

V-10-b. Technique en milieu liquide : Méthode de dilution

b-1. Méthode des disques de Sarbach :

L'huile essentielle est déposée à différentes concentrations sur des disques en papier filtre de 10 mm de diamètre, l'HE est placée dans des tubes à essai. Dans chaque tube est réparti un certain volume de bouillon nutritif ensemencé. Une agitation mécanique est assurée pendant toute la durée de l'incubation. Le pouvoir bactéricide est apprécié par l'évaluation du pourcentage de survivants par repiquage en milieu solide (22).

b-2. Détermination de la CMI et CMB :

La concentration minimale inhibitrice CMI est utilisée par plusieurs chercheurs pour prouver la performance antimicrobienne d'une HE. La CMI est définie comme la plus petite concentration



dont résulte la maintenance ou la réduction de l'inoculum après 18-24h d'incubation, elle consiste à disperser l'agent antimicrobien en concentration variable de façon homogène et stable dans le milieu de culture du germe étudié. Cette technique, très fiable et reproductible pour les agents antimicrobiens hydrosolubles, pose un problème de diffusion et d'homogénéité de dispersion avec les HE qui ont une très faible solubilité dans les milieux de culture aqueux. Ce problème a été résolu en partie par l'utilisation d'émulsions des HE dans des solutions de différents détergents comme le Tween 20 et le Tween 80 ou de solvant comme l'éthanol (41).

La CMB est la plus petite concentration de l'huile essentielle qui ne laisse que 0.01% ou moins de survivants de l'inoculum initial après 18h d'incubation à une température de 37°C.

I-Lieu et période de l'étude :

Nous nous sommes proposés d'évaluer l'activité antibactérienne des huiles essentielles sur des bactéries pathogènes responsables des toxi-infections Alimentaires.

Ce travail est d'une durée de 5 mois, du 10 janvier au 10 juin 2011, il a été réalisé sur deux volets :

Le premier volet concerne l'extraction des huiles essentielles et leur caractérisation, il a été effectué au sein du laboratoire de valorisation et application industrielle de l'institut National des plantes Médicinales et aromatique de TAOUNAT. (Annexe 1)

Le deuxième volet concerne la détermination de l'activité antibactérienne des huiles essentielles par des testes de sensibilité et a été effectué au sein du laboratoire Régionale de Diagnostic Epidémiologique et d'Hygiène du Milieu. (Annexe 2)

II- Matériel végétal :

II-1. Choix des plantes :

Le choix des plantes s'est basé sur une recherche bibliographique visant les plantes médicinales dont les huiles essentielles sont connues par leur activité antiseptique sur plusieurs souches bactériennes et de leur disponibilité au Maroc. Les plantes retenues sont présentées dans le (Tableau 1) :

Tableau 1 : Liste des plantes et auteurs

<i>Plante</i>	<i>Auteur</i>
<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Carl von Linné</i>
<i>Origanum vulgare</i>	<i>Carl von Linné</i>
<i>Cymbopogon citratus</i>	<i>Augustin Pyrame de Candolle</i>
<i>Ammi visnaga</i>	<i>Joseph Gärtner</i>



<i>Thymus saturéioïdis</i>	<i>Carl von Linné</i>
<i>Rosmarinus officinalis</i>	<i>Carl von Linné</i>

II-2. Récolte des plantes et extraction des huiles essentielles :

II-2-a. Récolte des plantes :

Les échantillons de plantes de *<Thymus vulgaris, Origanum vulgar, Cymbopogon citratus, Rosmarinus officinalis>* ont été récoltés à partir du jardin de l'institut national des plantes médicinales et aromatique de Taounate alors que *< Ammi visnaga, Thymus saturéioïdis>* ont été fournis par les services des eaux et des forêts d'Ifrane.

II-2-b. Détermination du Taux d'humidité :

Le Taux d'humidité correspond à la quantité d'eau perdue par une plante, lors d'un séchage à 100°C pendant 24 heures :

20g de chaque échantillon de plante a été séché dans une étuve à ventilation forcée à 100 °C pendant 24h.



Figure 6 : étuve à ventilation forcée

Pour calculer le taux d'humidité pour un échantillon donné on utilise l'équation suivante :

$$\text{TH} : (X-Y/X) \times 100$$

x= Le poids initial
Y= Le poids Après séchage

II-2-c. Extraction des huiles essentielles :

On utilise le procédé qui consiste à immerger la matière première végétale dans de l'eau. L'ensemble est ensuite porté à ébullition. La chaleur permet l'éclatement et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales. La vapeur d'eau et les composés volatils rentrent en contact avec une surface froide ce qui permet le passage à l'état liquide et les deux liquides de densité différentes sont ensuite séparés par simple décantation.

On prend des fractions de 200g à partir des parties aériennes des plantes choisies et on les met dans un ballon d'1 L remplis à moitié d'eau. Les huiles essentielles ont été obtenues par entraînement à la vapeur d'eau à l'aide d'un distillateur de type Clevenger pendant 3h.

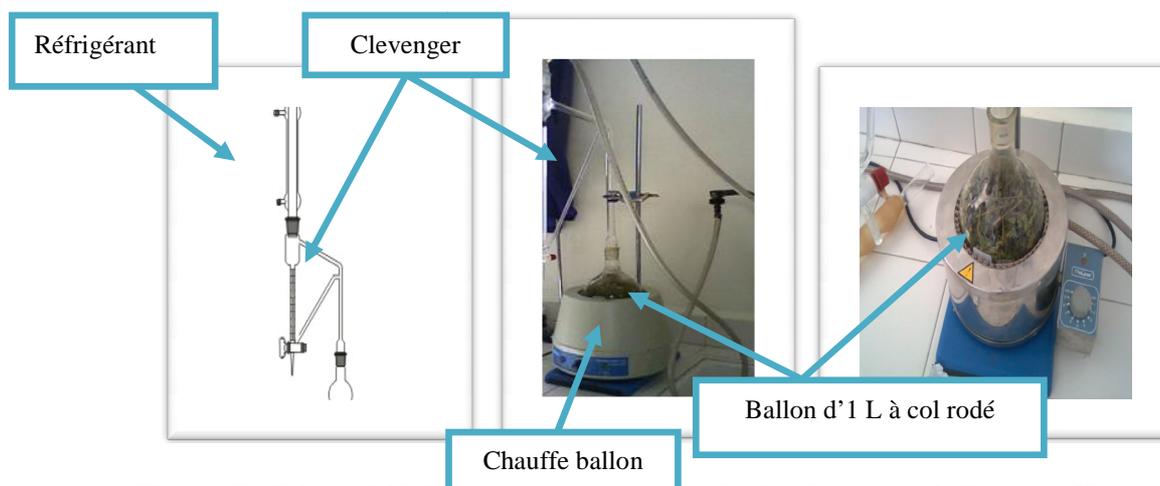


Figure 7 : Dispositif de l'hydrodistillation des huiles essentielles par Clevenger

Les huiles essentielles sont recueillies par décantation à la fin de la distillation et mises dans des flacons teintés afin d'éviter les rayons lumineux et conservées à 4 C°.

Le rendement (R) de l'huile essentielle est calculé à l'aide de la formule suivante :

$$R = \frac{\text{masse d'huile essentielle}}{\text{masse du matériel végétal utilisé} - (\text{TH} \times \text{masse du matériel végétal})} \times 100$$

II-3. Analyse de la composition chimique des huiles essentielles :

La composition chimique des huiles essentielles a été analysée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-MS) : Cette technique consiste à analyser les huiles essentielles, tout d'abord, par Chromatographie en Phase gazeuse (CPG) ; cette technique chromatographique permet l'individualisation des constituants, leur quantification et le calcul de leurs indices de rétention (Ir), puis à les analyser par le couplage « en ligne » avec la spectrométrie de masse (SM). L'identification est ensuite réalisée par comparaison des indices de rétention Ir et des données spectrales des constituants individualisés avec les caractéristiques de produits de référence contenus dans des bibliothèques de spectres.

II-3-a. Conditions expérimentales :

Les analyses de la composition chimique des huiles essentielles par CPG-SM sont réalisées au Centre Nationale pour la Recherche Scientifique et Technique (CNRST).

Appareillage : chromatographe à phase gazeuse (*Trace GC ULTRA*) couplé à un spectromètre de masse (*Polaris Q MS* à trappe ionique).

Type d'ionisation : EI (70 eV)

Type de solvant : Acétate d'éthyle

Type de colonne : VB-5 (Methylpolysiloxane à 5% phenyl),

Longueur : 30 m

Diamètre interne : 0.25 mm

Epaisseur du film : 0.25 µm.

Conditions d'injections :



Tableau 2 : Condition d'injection des échantillons

Volume d'injection	1µl
Température d'injection	220°C
Température d'interface	300°C
Mode d'injection	Split
Gaz vecteur	Hélium
Débit	1.4 ml/min

Conditions de séparation :

Tableau 3 : Condition de séparation des échantillons

Rampe (°C/min)	Température finale (°C)	Temps (min)
	40	2.00
4	180	0.00
20	300	2.00

Température de la source d'ionisation : 200°C.

La base de données utilisée : NIST MS Search.

III- Matériel Biologique :

III-1. Choix des souches bactériennes :

Nous nous sommes intéressés dans cette étude à des bactéries qui sont responsables des toxi-infections alimentaires (TIA) et des toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) dans la région de Fès-Boulmane. Les souches les plus fréquentes dans les échantillons analysés sont :

-  -*Salmonella sp*;
-  -*Staphylococcus aureus* ;
-  -*Escherichia coli*.

III-2. Conservation et culture bactérienne :

III-2-a. Conservation :

Les souches bactériennes fournies ont été caractérisées et identifiées par le laboratoire d'accueil.



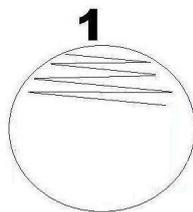
Figure 8 : Dispositif de congélation et de conservation des souches bactériennes

III-2-b. Culture bactérienne en milieu solide :

Après avoir décongelé les souches qui feront l'objet de notre étude, on prépare le milieu de culture < Plate Count Agar, PCA> qu'on coule après dans des boîtes pétri.

Pour la culture des bactéries on procède de la manière suivante :

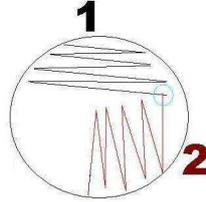
- On désinfecte tout d'abord à l'alcool notre espace de travail ;
- On allume le bec Bunzen en prenant soin d'obtenir une flamme bleue, afin de stériliser l'air aux alentours d'un rayon de 20 centimètres ;
- On passe l'anse dans la flamme du bec Bunzen jusqu'à ce qu'elle devienne incandescente, dans le but de la stériliser ;
- On patiente quelques secondes le temps que la température diminue, puis on plonge l'anse dans la solution bactérienne décongelée, une gouttelette reste "prisonnière" de la boucle de l'anse. C'est ce volume que nous allons ensemer sur notre milieu,
- On ouvre la boîte de Pétri où se trouve notre milieu de culture solidifié et refroidi, et on la divise mentalement en 3 parties égales ;
- On dépose la solution microbienne avec l'anse dans la 1^{er} tiers de la boîte en effectuant des stries dans un mouvement de va-et-vient, en prenant soin de ne pas traverser, creuser ou arracher le milieu. On doit la déposer uniquement en surface ;



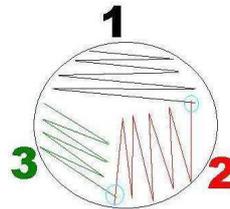
- On referme la boîte de Pétri et on plonge à nouveau l'anse dans la flamme du bec jusqu'à incandescence. On patiente quelques secondes le temps qu'elle refroidisse ;



- On rouvre notre boîte de Pétri, et on effectue le même mouvement de stries dans le 2^{ème} tiers de la boîte, en prenant soin de repasser sur l'extrémité de la dernière strie effectuée précédemment sur le 1^{er} tiers ;



- Comme précédemment, on fait des stries dans le 3^{ème} et dernier tiers de notre boîte, en prenant grand soin de récupérer de la solution en repassant une seule fois sur l'extrémité de la dernière strie effectuée dans le 2^{ème} tiers ;



- Notre milieu est ainsiensemencé avec la solution bactérienne. On incube nos boîtes pendant 24 h à une température de 37 C°.

III-2-c. Culture bactérienne en milieu liquide (la préculture):

La pré-culture c'est le passage d'une culture bactérienne du milieu solide en milieu liquide : pour cela, on prend à l'aide d'une anse stérile une colonie bien isolée sur une boîte de Pétrie ou il y a une excellente croissance bactérienne et on l'introduit dans 10 ml du « Boillon Nutritif », on laisse à température d'incubation pendant une nuit. C'est une culture en liquide dite en Batch.

IV-Etude de l'effet des huiles essentielles :

Les huiles essentielles des plantes aromatique sont douées d'un pouvoir antimicrobien reconnu. Cependant, l'étude de cette activité antimicrobienne se heurte à des difficultés importantes :

- les huiles essentielles présentent une composition complexe ;
- leurs constituants sont peut ou pas soluble dans l'eau.

IV-1. Etude de l'effet des huiles essentielles en milieu liquide :

L'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles en milieu liquide se heurte principalement au problème d'insolubilité dans les milieux de culture aqueux. Pour remédier à ce problème. Les chercheurs utilisent généralement pour disperser les HE des solvants tels que l'éthanol (42) ou des émulsifiants tels que le Tween 20 (43) ou des gélifiants à faible concentration comme l'Agar (44).

IV-1-a. Etude de la cinétique de croissance des bactéries en fonction des agents de dispersion :

Le but de cette étude est d'évaluer l'effet des agents de dispersion utilisés par divers chercheurs sur la croissance bactérienne.

a-1. Mode opératoire :

L'étude de la cinétique de croissance des bactéries en fonctions des agents de dispersion a été réalisée sur milieu liquide sous des conditions batch. Dans des erlenmeyers de 250 ml contenant 100 ml du milieu de culture aqueux « Boillon nutritif » aux quels on ajoute les différents agents de dispersion qui feront l'objet de cette étude. Le tableau 4 nous montre la composition de chaque milieu :

Tableau 4 : Composition des milieux de culture + agents de dispersion

Milieux	Composition
1	100 ml du boillon nutritif+ 0,25% d'éthanol
2	100 ml du boillon nutritif+ 0,25% du Tween 20
3	100 ml du boillon nutritif (témoin)
4	100 ml du boillon nutritif+0,02% d'agar
5	100 ml du boillon nutritif+ 0,04% d'agar
6	100 ml du boillon nutritif+0,06% d'agar
7	100 ml du boillon nutritif+0,08% d'agar
8	100ml du boillon nutritif+ 0,1% d'agar

-Ces milieux sont préparés stérilement dans des erlenmeyers de 250 ml, après on ajoute aseptiquement les agents de dispersion.



Figure 9 : Préparation des milieux de cultures + agents de dispersion

- Après avoir préparé nos milieux de culture plus les agents de dispersion décrits dans le (tableau 4), on ensemence tous les milieux au ($1/100$; 10^8 cellules/ml) par la préculture préparée précédemment.
- On note la densité optique à 620 nm d'un prélèvement de chaque milieu à t_0 .
- On introduit le tout dans une étuve à 37 C° avec une agitation de 50 tr/min.



Figure 10 : Dispositif d'étude de l'effet des huiles essentielles

-On fait le suivi de la croissance bactérienne par la lecture de la densité optique à 620 nm après chaque 2h.

-Après avoir terminé l'étude on obtient les densités optiques à t0 et après chaque 2h (Tableau 5) ce qui va nous permettre de tracer les courbes de croissance des bactéries (La densité optique en fonction du temps), de calculer le taux de croissance $\langle \mu \rangle$ et le temps de génération $\langle G \rangle$.

$$\mu = (\ln(X2) - \ln(X1)) / t2 - t1$$

$$G = \ln(2) / \mu$$

Avec : - X2 = la densité optique au temps t2

- X1 = la densité optique au temps t1

Tableau 5 : Densité optique à 620 nm de chaque milieu à t0 et après chaque 2h

temps(h)	agar 0,1	agar 0,08	agar 0,06	agar 0,04	agar 0,02	Agar0	éthanol	Tween 20
t 0								
t 0+2h								
t 0+4h								
t 0+6H								
t 0+8H								

N.B : Ces expériences ont été réalisées trois fois sur les trois souches « *Salmonella*, *Staphylococcus Aureus* et *Escherichia Coli* ».

IV-1-b. Evaluation de l'effet des huiles essentielles et de l'agar par la méthode des plans d'expériences :

b-1. Introduction :

Puisque les huiles essentielles sont utilisées sous forme dispersée par l'agar dans notre étude, nous avons jugé utile d'étudier les huiles essentielles et leurs interactions avec l'agar. Dans ce sens, nous avons fait appel à la méthode des plans d'expériences pour étudier l'effet des huiles essentielles, de l'agar et leurs interactions et ceci pour étudier l'effet de chaque facteur sur la croissance bactérienne et pour optimiser l'action des huiles essentielles ultérieurement.



b-2. PLAN D'EXPERIENCES :

Le plan factoriel complet 2^k correspond à un système à P variables où chacune peut prendre deux niveaux : un niveau supérieur z (+1) et un niveau inférieur z (-1). Les niveaux des facteurs constituent les frontières du domaine étudié.

Les variables (Z_1), (Z_2) et (Z_3) sont des variables naturelles, il est impossible de les comparer ou de comparer leurs effets. Nous avons alors utilisé des variables codées qui permettent de faciliter les calculs.

Ainsi, nous passerons d'un système de coordonnées z_1, z_2, \dots, z_k à un nouveau système dont les coordonnées x_1, x_2, \dots, x_k sont sans dimensions « variables codées ».

Dans le système de coordonnées sans dimensions, le niveau supérieur est égal à +1, le niveau inférieur est égal à -1 et les coordonnées du centre du plan sont nulles et coïncident avec l'origine des coordonnées. Par exemple lorsque $k = 2$, le nombre N de combinaisons possibles de deux facteurs sur deux niveaux est égal à $2^k = 2^2 = 4$.

Nous noterons le plan d'exécution des expériences (matrice de planification) sous la forme du tableau suivant : y

Tableau 6 : Matrice de planification 2^2

Variables / N° d'essai	x_1	x_2	y
1	-1	-1	y_1
2	+1	-1	y_2
3	-1	+1	y_3
4	+1	+1	y_4

Les valeurs de la sortie y (fonction de réponse ou taux de croissance) obtenues au terme de la réalisation du plan des expériences sont données dans la dernière colonne du tableau. Nous écrivons la matrice codée de planification 2^2 et les résultats des expériences en introduisant la variable dite fictive : $x_0 = 1$ et les interactions des facteurs.

Tableau 7 : Matrice de planification avec variable fictive et interaction

Variable/ N° d'essai	X_0	X_1	X_2	X_{12}	Y
1	1	-1	-1	1	Y_1
2	1	1	-1	-1	Y_2
3	1	-1	1	-1	Y_3
4	1	1	1	1	Y_4

La matrice de dans le tableau suivantes :

planification figurant possède les propriétés



$$\sum_{i=1}^N x_{iu} \cdot x_{ij} = 0, u \neq j, u, j = 1, 2, 3, \dots, k \text{ (eqa1)}$$

$$\sum_{i=1}^N x_{ij} = 0, j = 1, 2, 3, \dots, k \text{ (eqa2)}$$

$$\sum_{i=1}^N x_j^2 = N, j = 1, 2, 3, \dots, k \text{ (eqa3)}$$

Où k est le nombre de facteurs indépendants et N celui des essais dans la matrice de planification.

La première propriété (eqa 1) « l'égalité à 0 des produits scalaires de tous les vecteurs colonnes » s'appelle la propriété d'orthogonalité de la matrice de planification. Grâce à ces trois propriétés (équations 1, 2 et 3), les difficultés liées au calcul des coefficients de l'équation de régression sont fortement réduites, du fait que la matrice des coefficients la matrice d'information (${}^t\mathbf{X} \cdot \mathbf{X}$) devient diagonale et que ses éléments diagonaux sont égaux au nombre N d'essais dans la matrice de planification.

Chaque point expérimental apporte une valeur de la réponse. Or, cette réponse est modélisée par un polynôme dont les coefficients sont les inconnus qu'il faut déterminer. A la fin du plan d'expérience, on a un système de n équations (s'il y a n essais) à p inconnus (s'il y a p coefficients dans le modèle choisi à priori). Ce système s'écrit d'une manière simple en notation matricielle :

$$Y = X \cdot \beta + \varepsilon$$

Avec Y = vecteur de réponse,

X = matrice de calcul, qui dépend des points expérimentaux choisis pour exécuter le plan et le modèle postulé,

β = vecteur des coefficients,

ε = vecteur des résidus

On obtient ainsi les estimations des coefficients que l'on note « b ».

Le résultat de ce calcul :

$$b = ({}^tXX)^{-1} \cdot {}^tXY$$

C'est une formule dans laquelle la matrice ${}^t\mathbf{X}$ est la matrice transposée de \mathbf{X} .

Ainsi, deux matrices interviennent constamment dans la théorie des plans d'expériences :

- la matrice d'information tXX ,
- la matrice de dispersion tXY

Dans le cas des plans factoriels à deux niveaux, la matrice X est particulière. C'est une matrice orthogonale de Hadamard qui présente la propriété suivante :

$${}^tXX = NI$$

Où N = nombre d'essais et I la matrice unité.

Si on rapporte cette expression dans la formule précédente, on obtient :



$$b = (NI)^{-1} \cdot {}^t XY = \frac{1}{N} {}^t XY$$

Donc, tout coefficient b_j de l'équation de régression est déterminé par le produit scalaire de la colonne y par la colonne x_j correspondante, divisé par le nombre d'essais N dans la matrice de planification :

$$b_j = \frac{\sum_{i=1}^N x_{ij} \cdot y_i}{N}$$

La matrice d'expériences, correspondant aux variables codées, regroupe toutes les combinaisons possibles des variables codées (2^k), prises chacune à ses deux niveaux. Le plan factoriel complet permet de déterminer la valeur attribuée à chacun des facteurs ainsi que celle de toutes leurs interactions. Si cette fonction de réponse est continue dans le domaine expérimental étudié ($\square Z$) et si de plus elle est infiniment dérivable, elle pourra être développée en série de Taylor au voisinage du centre du domaine expérimental.

$$y = b_0 + \sum_{i=1}^N b_i x_i + \sum_{j=2}^N \sum b_{ij} \cdot x_i x_j$$

b_0 = constante du modèle

b_i = coefficients traduisant les effets principaux des variables

b_{ij} = coefficients traduisant les interactions du premier ordre.

IV-1-C. Mode opératoire :

Les facteurs pris en compte dans notre étude sont :

X1= Volume de l'huile essentielle ajouté

X2= Concentration de l'agent de dispersion « l'Agar »

Tableau 8 : niveaux supérieurs et inférieurs des facteurs

Facteurs	Niveaux	
	+1	-1
X1 : concentration de l'agar	0,1%	0,02%
X2 : volume de l'huile essentielle	0,1%	0,01%

Dans ce cas, le plan factoriel complet est de type 2^2 , 4 expériences différentes sont nécessaires pour la détermination des valeurs de la fonction de réponse et qui est le taux de croissance de la phase exponentielle.

-Les quatre expériences sont les suivantes :

Tableau 9 : Expériences du plan d'expérience 2² avec interaction

Expérience	Mode opératoire
1	10 µl HE + solution à 0,02% d'agar
2	100 µl HE+ solution à 0,02 d'agar
3	10 µl HE + solution à 0,1% d'agar
4	100 µl HE + solution à 0,1% d'agar

Nous procédons comme pour l'étude cinétique des agents de dispersion sur la croissance bactérienne : on note la densité optique de chaque solution à t_0 , t_0+2 , t_0+4 , t_0+6 et t_0+8 pour pouvoir ensuite calculer le taux de croissance de la phase exponentielle qui est la réponse de chaque expérimentation. La réponse va nous être utile pour déterminer la fonction de réponse de chaque plan d'expérience en utilisant les formules décrites précédemment.

IV-2. Etude de l'effet des huiles essentielles en milieu solide : La méthode des disques d'agar:

Dans cette méthode, on utilise des disques en gélose de 6 mm de diamètre, ou on a piégé un volume de (1,5 µl) de l'huile essentielle et déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé en surface à l'aide d'une suspension bactérienne.

Les tests sont effectués sur le milieu de culture « Gélose Nutritives » coulé dans les boîtes de pétrie « 90 mm » de diamètre en plastique.

On prépare un inoculum à partir d'une culture fraîche, après on étale 100 µl de ce dernier sur la boîte de Pétri;

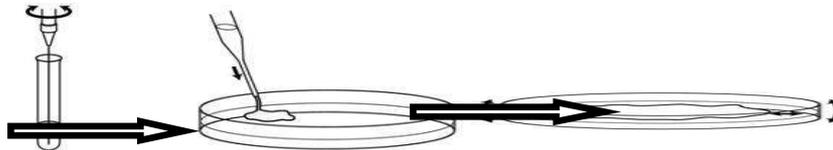


Figure 11 : Méthode des disques/ Etalement de l'inoculum

- On laisse sécher à la température ambiante pendant quelque minute ;
- On dépose les disques imprégnés d'huile essentielles « 6 mm » de diamètre séparés de 24 mm sur le milieu de culture déjà ensemencé;
- On incube la boîte 24h à une température de 37°C.

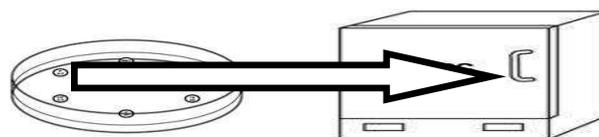


Figure 12 : Méthode des disques/ Incubation

- Après incubation on mesure le diamètre (en Cm) de l'auréole d'inhibition.

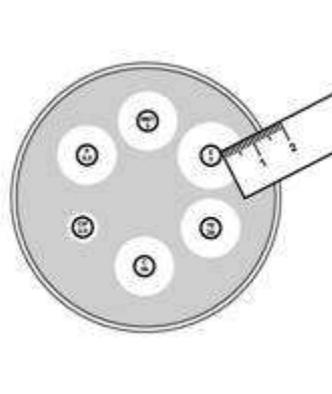


Figure 13 : Mesure des diamètres d'inhibitions

I-Matériel végétal :

I-1. Identification des plantes :

L'identification botanique des six espèces végétales est représentée dans le tableau suivant :

Tableau 10 : Identification botanique des espèces végétales

Espèce végétale	Famille botanique
<i>Thymus vulgaris</i>	Lamiaceae
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Lamiaceae
<i>Ammi Visnaga</i>	Apiaceae
<i>Cymbopogon citratus</i>	Poaceae
<i>Origanum vulgare</i>	Lamiaceae
<i>Thymus Saturéioidis</i>	Lamiaceae



- Classification Classique de *Thymus vulgaris* :

Règne : *Plantae*
Division : *Magnoliophyta*
Classe : *Magnoliopsida*
Ordre : *Lamiales*
Famille : *Lamiaceae*
Genre : *Thymus*

Division : *Magnoliophyta*
Classe : *Magnoliopsida*
Ordre : *Lamiales*
Famille : *Lamiaceae*
Genre : *Rosmarinus*



Classification Classique
de *Rosmarinus officinalis* :

Règne : *Plantae*

Classification Classique
d'*Ammi visnaga* :

Règne : *Plantae*
Division :
Magnoliophyta
Classe : *Magnoliopsida*
Ordre : *Apiales*



Famille : *Apiaceae*
Genre : *Visnaga*

Classification Classique de *Cymbopogon citratus*:

Règne : *Plantae*
Division : *Magnoliophyta*
Classe : *Liliopsida*
Ordre : *Cyperales*
Famille : *Poaceae*
Genre : *Cymbopogon*



Classification Classique de
l'*Origanum vulgare* :

Règne : *Plantae*
Division : *Magnoliophyta*
Classe : *Magnoliopsida*
Ordre : *Lamiales*
Famille : *Lamiaceae*
Genre : *Origanum*



Classification Classique de *Thymus Saturioides* :

Règne : *Plantae*
Division : *Magnoliophyta*
Classe : *Magnoliopsida*
Ordre : *Lamiales*
Famille : *Lamiaceae*
Genre : *Thymus*

I-2. Taux d'humidité :

La teneur en eau présente dans nos espèces végétales est représentée dans le tableau suivant:

Tableau 11 : Taux d'humidité présent dans chaque espèce végétale

Espèces végétales	Taux d'humidité %
<i>Thymus saturioides</i>	40
<i>Rosmarinus officinalis</i>	28,5
<i>Ammi Visnaga</i>	35,7
<i>Cymbopogon citratus</i>	38
<i>Origanum vulgare</i>	72,5
<i>Thymus Saturioidis</i>	40

Le taux d'humidité des plantes de 28,5% pour *Rosmarinus officinalis* à 72,5% pour *Origanum vulgare*.

varie dans notre gamme de *Rosmarinus officinalis* à 72,5

I-3. Extraction des huiles essentielles :

Le rendement et la couleur des huiles essentielles sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 12 : Rendement et couleur des huiles essentielles

Espèce végétales	Couleur d'HE	Rendement d'HE %
<i>Thymus vulgaris</i>	Jaune pale	0,5
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Transparente	1,6
<i>Ammi Visnaga</i>	Transparente	0,9
<i>Cymbopogon citratus</i>	Jaune pale	0,54
<i>Origanum vulgare</i>	Brun foncé	1,66
<i>Thymus Saturioidis</i>	Jaune brun	1,1

De ces résultats on constate que les rendements pondéraux sont faibles, ils varient dans notre gamme de 0,5 pour *Thymus vulgaris* à 1,66 pour *Origanum Vulgar*.

Les huiles essentielles d'*Origanum Vulgar*, *Rosmarinus Officinalis* et *Thymus Saturioidis* présentent les rendements les plus élevés.

Ces différences dans le rendement des huiles essentielles de chaque plante doivent être essentiellement dues aux voies métaboliques propres à chaque végétal.

Il faut prendre en considération que les rendements des HE dépendent de plusieurs facteurs comme : l'espèce, le milieu de récolte, la période de récolte, les technique d'extraction et les pratique culturales.



I-4. Composition chimique des huiles essentielles :

I-4-a. Composition chimique de l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* :

Les constituants chimiques de l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* analysés par CPG-SM sont représentés dans le (tableau 13), **Le Linalol** est le composé majoritaire avec **28,93%** suivis du **2-méthylbutanoate de 2-méthylbutyle** avec **19,24%**.

Tableau 13 : Composition chimique de l'huile essentielle d'*Ammi Visnaga*

Composé	Pourcentage %
isobutanoate de butyle	1.50
α -thujene	0.38
α -pinène	0.76
Sabinène	1.18
Myrcène	0.97
2-méthylbutanoate de butyle	3.20
3-méthyl butanoate d'isobutyle	1.29
2-méthyl propanoate de 3-méthylbutyle	1.74
Isobutanoate de 2-méthylbutyle	12.61
Limonène	1.21
Cis-ocimene	1.01
(E)- β -Ocimene	1.88
(Z)-pent-2-enyl butanoate	0.45
linalol	28.93
2-méthylbutanoate de 2-méthylbutyle	19.24
3-méthyl butanoate d'isoamyle	7.21
1-terpinen-4-ol	0.33
α -terpineol	0.41
Linalyl acétate	0.32
trans-Caryophyllene	0.10

I-4-b. Composition chimique de l'huile essentielle du *Thymus satureioides* :

Les constituants chimiques de l'huile essentielle de *Thymus satureioidis* analysés par CPG-SM sont représentés dans le (tableau 14). **L'*p*-cymène** est l'élément majoritaire avec une teneur de **27,59%**, suivi du **Thymol** avec **14,09%**.

Tableau 14 : Composition chimique de l'huile essentielle du *Thymus satureioides*

Composé	Pourcentage %
n-butylacétate	1.04
Camphene	1.48
Sabinène	0.37



1-octen 3-ol	0.53
β -pinène	2.02
3-Octanol	0.19
α -phéllandrène	0.25
α -terpinène	2.16
p-cymène	27.59
Limonène	1.83
Gamma terpinène	10.74
Linalool	8.79
Camphre	0.19
Borneol	2.59
1-terpinen-4-ol	0.83
p-cymenol	0.15
α -terpineol	0.18
Carvacrol methyl ether	1.86
Bornyl acetate	0.13
Thymol	14.09
Carvacrol	5.49
trans-Caryophyllene	4.08
Caryophyllene oxide	0.80

I-4-c. Composition chimique de l'huile essentielle de Rosmarinus Officinalis :

Les constituants chimiques de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* analysés par CPG-SM sont représentés dans le (tableau 15). L' **α -pinène** est l'élément majoritaire avec une teneur de **35.91%**, suivi du **1,8-cinéole** avec **23.64%**.

Tableau 15 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Rosmarinus Officinalis*

Composé	Pourcentage(%)
α-pinène	35.91
Camphène	5.73
Sabinène	4.64
3-octanone	0.73
β -myrcène	1.58
α -terpinène	0.86
1,8-cinéole	23.64
Cis - ocimène	0.44
γ -terpinène	1.37
Terpinolène	1.40
Linalool	1.67
Chrysanthone	0.42
Camphre	5.01
Bornéol	2.69
α -terpineol	2.04
Verbénone	4.46
acétate de bornyle	2.30



Caryophyllène	3.51
β -humulène	1.27

I-4-d. Composition chimique de l'huile essentielle de Thymus Vulgaris :

Les constituants chimiques de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* analysés par CPG-SM sont représentés dans le (tableau 16), le **Thymol** est le composé majoritaire avec **41,39%** suivis du **γ -terpinène** avec **22,25%**.

Tableau 16 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Thymus Vulgaris*

Composé	Pourcentage %
Methyl 2-methylbutanoate	0.18
α -thujène	1.76
α -pinène	0.85
camphène	0.40
Sabinène	0.33
2-hexen-1-ol 2-ethyl	0.41
β -pinène	1.63
α -phellandrène	0.28
α -terpinène	3.25
p-cymène	15.59
γ-terpinène	22.25
p-menth-2-en-1-ol	0.65
Terpinolène	0.16
Linalol	1.79
Camphre	0.24
Bornéol	0.65
4-terpinéol	1.15
Thymol methyl ether	1.18
2-isopropyl-4-methylanisole	0.88
Thymol	41.39
Carvacrol	2.06
Isothymol	0.27
Caryophyllène	1.30
Germacrène D	0.40

I-4-e. Composition chimique de l'huile essentielle de Cymbopogon citratus :

Les constituants chimiques de l'huile essentielle de *Cymbopogon citratus* analysés par CPG-SM sont représentés dans le (tableau 17), le **Geranial** est le composé majoritaire avec **39,5 %** suivis du **Neral** avec **33,3%**.

Tableau 17 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Cymbopogon citratus*

Composé	Pourcentage(%)
6-methyl-5-Hepten-2-one	1,2



Myrcene	11,4
(Z)- β -Ocimene	0,7
(E)- β -Ocimene	0,3
6,7-Epoxyocimene	0,3
Linalool	1,3
Citronellal	0,1
Nerol	0,3
β -Citronellol	0,3
Neral	33,3
Geraniol	3,1
Geranial	39,5
2-Undecanone	0,5
Geranyl acetate	0,2
(E)-Caryophyllene	0,1
α -(E)-Bergamotene	0,1
2-Tridecanone	0,4
δ -Cadinene	0,1
5-epi-7-epi-a-Eudesmol	0,1
α -Cadinol	0,2

I-4-f. Composition chimique de l'huile essentielle de l'Origanum vulgare :

Les constituants chimiques de l'huile essentielle de *l'Origanum vulgare* analysés par CPG-SM sont représentés dans le (tableau 18), le **Carvacrol** est le composé majoritaire avec **23,82 %** suivis du **γ -Terpinène** avec **23,4%**.

Tableau 18 : Composition chimique de l'huile essentielle de *l'Origanum vulgare*

Composé	Pourcentage %
α -Thujène	2.26
α -Pinène	2.14
Camphène	0.35
1-Octen-3-ol	0.38
β -Pinène	0.36
3-Octanone	0.30
Myrcène	3.88
α -Phéllandrène	0.53
3-Carene	0.23
α -Terpinène	4.58
p-Cymène	19.89
β -phellandrène	1.16
γ-Terpinène	23.40
α -Terpinolène	0.47



Linalool	2.87
4-Terpinéol	0.89
α -Terpinéol	0.34
Thymol	9.76
Carvacrol	23.82
trans-Caryophyllène	2.38

II-Matériel biologique :

Les souches bactériennes ont été fournies par le laboratoire d'accueil, elles ont été identifiées, confirmées et conservées dans des tubes par congélation dans les milieux de cultures spécifiques à chaque souche contenant 20% du Glycérol à une température de -80 C° . Le tableau suivant nous représente ces différentes souches :

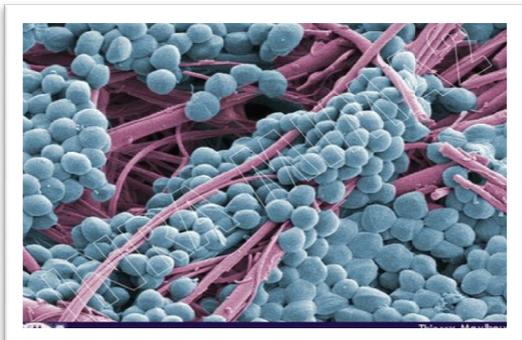
Tableau 19 : Souches bactérienne et coloration de Gram

Espèce biologique	Coloration de Gram
<i>Escherichia coli</i>	A gram Négatif
<i>salmonella</i>	A gram Négatif
<i>Staphylococcus aureus</i>	A gram Positif



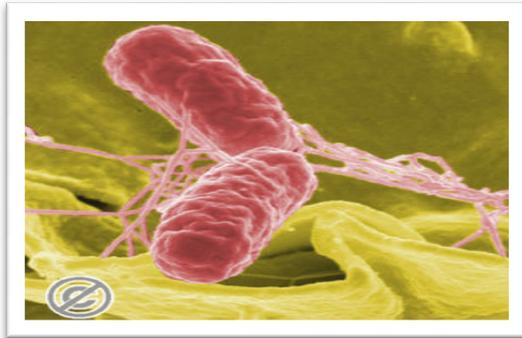
Classification d'*Escherichia coli*

Règne : *Bactéria*
Embranchement : *Proteobacteria*
Classe : *Gamma Proteobacteria*
Ordre : *Enterobacteriales*
Famille : *Enterobacteriaceae*
Genre : *Escherichia*
Espèce : *Coli*



Classification de *Staphylococcus Aureus*

Règne : *Bactéria*
Embranchement : *Firmicutes*
Classe : *Bacilli*
Ordre : *Bacillales*
Famille : *Staphylococcaceae*
Genre : *Staphylococcus*
Espèce : *Aureus*



Classification de *Salmonella Sp*

Règne : *Bactéria*
Embranchement : *Proteobacteria*
Classe : *Gamma Proteobacteria*
Ordre : *Enterobacteriales*
Famille : *Enterobacteriaceae*
Genre : *Salmonella*
Espèce : *Sp*

III-Effet des huiles essentielles sur la croissance bactérienne

:

III-1. Etude de l'effet des huiles essentielles en milieu liquide :

Le grand problème qui nuit l'usage des huiles essentielles c'est leur dispersion dans les milieux aqueux. Cette problématique a fait le vif du sujet de plusieurs études (38). Mais la plupart de ces études n'ont pas expliqué le phénomène de dispersion ni l'effet des agents de dispersion sur la croissance des micro-organismes étudiés. Dans cette lumière nous avons jugé utile de faire des études préliminaires aux agents de dispersion avant leur utilisation pour évaluer l'effet des huiles essentielles.

III-1-a. Cinétique de la croissance bactérienne par rapport aux agents de dispersion :

a-1. Cinétique de croissance de la souche *Escherichia Coli* :

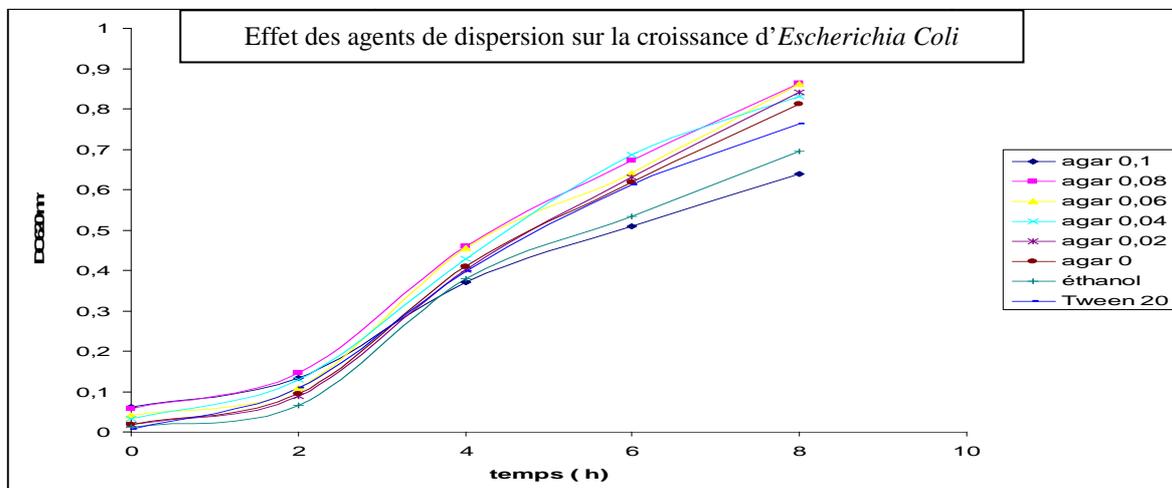


Figure 14: Effet des agents de dispersion (agar, éthanol et tween 20) sur la croissance de la souche *E coli*.

La figure 14 illustre des modèles de croissance normale des micro-organismes qui contiennent l'ensemble des phases physiologiques usuelles. La croissance commence par une phase de latence qui dure en moyenne 1h45 minutes. Après une phase d'accélération de 20 minutes culmine une phase exponentielle qui dure deux heures c'est la phase physiologique par excellence dédiée à l'étude de tous les phénomènes qui peuvent toucher la croissance microbienne. Après cette phase on note une réduction de croissance proportionnelle aux traitements par l'agar, l'éthanol et le tween 20.



Ces résultats montrent que l'agar est un inhibiteur de la croissance de la souche *E. coli*, cette réduction est proportionnelle avec la concentration de l'agar ajouté au milieu de culture. L'éthanol et tween 20 montrent à notre surprise une activation de la croissance.

Pour bien expliquer le phénomène nous avons calculé le taux de croissance et le temps de génération correspondant à chaque courbe de croissance (Tableau 20).

Tableau 20 : Taux de croissance et Temps de génération d'*E. Coli* en fonction des agents de dispersion

Milieu	agar 0,1	agar 0,08	agar 0,06	agar 0,04	agar 0,02	agar 0	éthanol	tween 20
μ (h ⁻¹)	0,17	0,21	0,21	0,29	0,33	0,36	0,37	0,6
G (min)	244,64	198,04	198,04	143,41	126,03	115,52	112,40	69,31

Cette analyse quantitative montre bien que l'agar est un agent inhibiteur de la croissance microbienne et que l'éthanol et le tween 20 sont des activateurs de sa croissance.

Les représentations graphiques (figure 15 et 16) illustrent l'effet de l'agar, l'éthanol et le Tween 20 sur le taux de croissance d'*E. coli* :

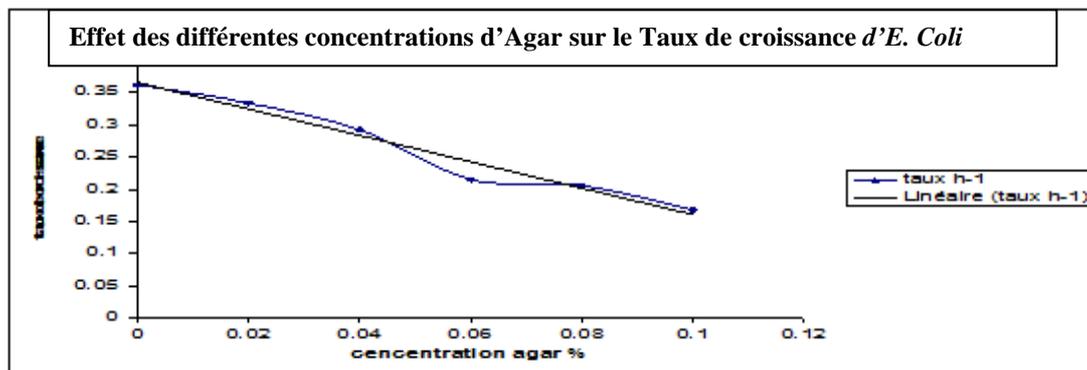


Figure 15 : Effet des différentes concentrations d'Agar sur le Taux de croissance d'*E. Coli* (Modèle linéaire)

La figure 15 montre que la réduction du taux de croissance obéit à une loi linéaire qui est essentiellement liée à ses tendances métaboliques (45).

Le choix du paramètre taux de croissance comme indice de la croissance est fondé sur le fait que le taux de croissance est une constante le long de la phase exponentielle. Ainsi ce paramètre semble être le plus adéquat pour évaluer la croissance.

Le taux de croissance de la souche *Staphylococcus Aureus* augmente vis-à-vis l'éthanol et le tween 20 par rapport à une croissance normale comme le montre la figure 20.

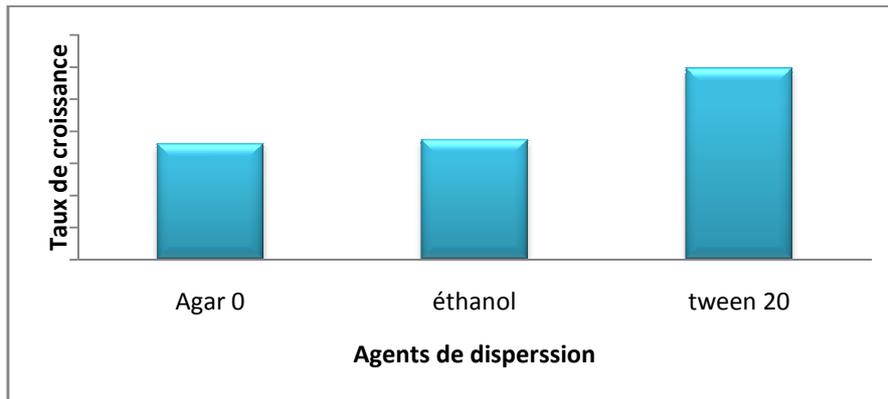


Figure 16: Effet de l'éthanol et le tween 20 sur le Taux de croissance d'*Escherichia Coli*

On remarque aussi que le temps de génération augmente en augmentant la concentration d'agar est diminuée avec les autres agents de dispersion ce qui confirme nos hypothèses.

a-2. Cinétique de croissance de la souche salmonella Sp:

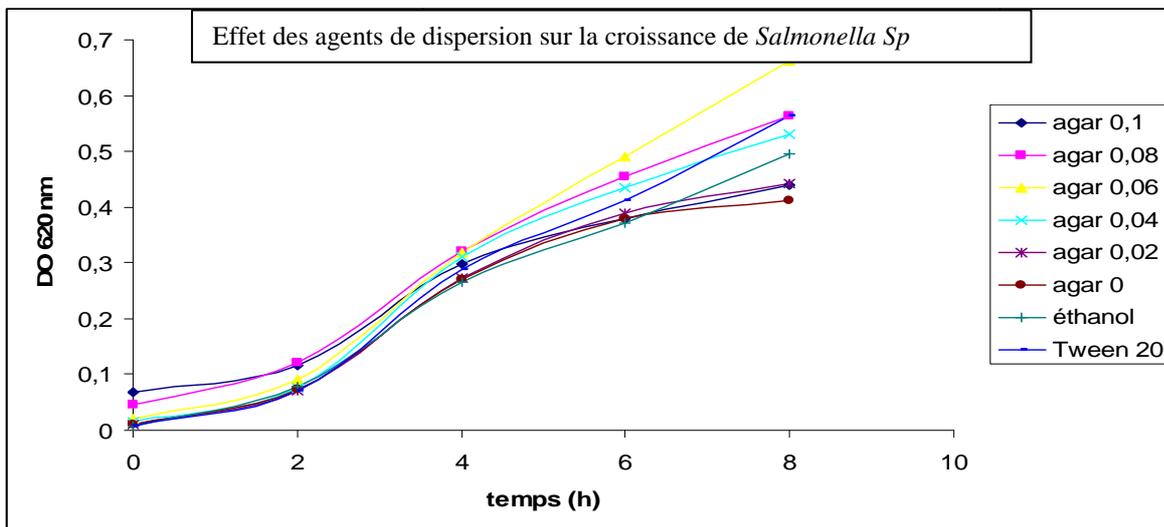


Figure 17 : Effet des agents de dispersion (Agar, éthanol et tween 20) sur la croissance de la souche *Salmonella Sp*

La figure 17 nous permet de visualiser la croissance de la souche *Salmonella Sp* avec ses différentes phases de croissance principales. La première phase de croissance qui dure en moyenne 1h45 min est une phase de latence ou d'adaptation ou la bactérie s'adapte avec le milieu par synthèse des biomolécules (ribosomes, ARN de transfert, ARN m.) nécessaire pour la croissance. Après une phase d'accélération éphémère qui dure presque 20 min, les bactéries se développent de façon maximale avec un taux de croissance maximal et constant pendant presque 2h, c'est la phase de croissance exponentielle. On remarque après une phase transitoire de ralentissement ou le taux de croissance commence à diminuer.

L'analyse des courbes de croissance de *Salmonella sp* sous différentes concentrations l'agar, l'éthanol et le tween 20 nous permet de souligner une autre fois que l'agar est un agent inhibiteur de la croissance microbienne et que l'éthanol et le Tween 20 sont des agents activateurs de la croissance.



Pour mieux comprendre le phénomène le tableau 21 nous montre la variation du taux de croissance et le temps de génération en fonction des agents de dispersion utilisés dans cette étude comparative :

Tableau 21 : Taux de croissance et Temps de génération de *Salmonella sp* en fonction des agents de dispersion

Milieu	Agar 0,1	Agar 0,08	Agar 0,06	agar 0,04	agar 0,02	Agar 0	éthanol	tween 20
μ (h-1)	0,11	0,21	0,32	0,35	0,4	0,41	0,52	0,51
G (min)	378,08	198,04	129,97	118,83	103,97	101,44	79,98	81,55

Le taux de croissance de la souche *Salmonella Sp* diminue d'une manière considérable, cette diminution logarithmique et proportionnelle aux concentrations d'agar, ce qui est illustré sur la figure 18. Ce modèle mathématique témoigne la sensibilité de la souche *Salmonella Sp* à la toxicité de l'agar qui est différente de celle de la souche *E. Coli*.

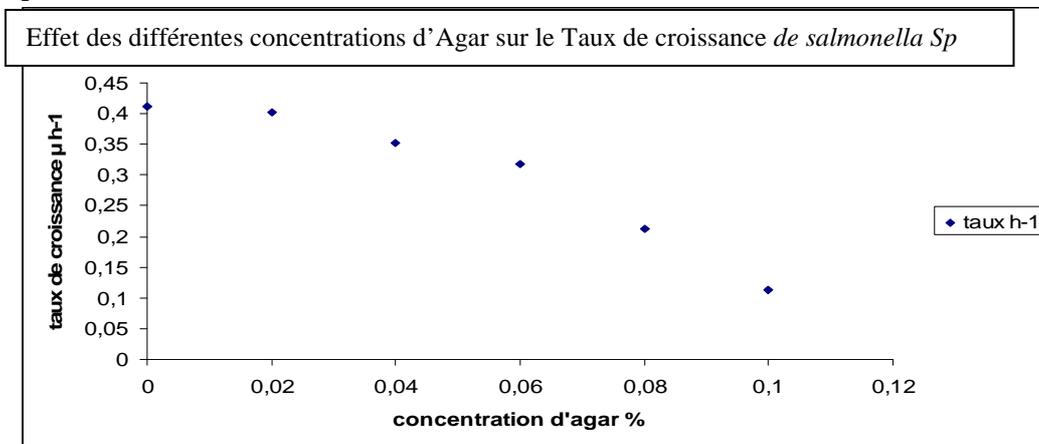


Figure 18 : Effet des différentes concentrations d'Agar sur le Taux de croissance de *Salmonella sp* (Modèle logarithmique)

Le taux de croissance de la souche *Salmonella sp* augmente vis-à-vis l'éthanol et le tween 20 par rapport à une croissance normale comme le montre la figure 19.

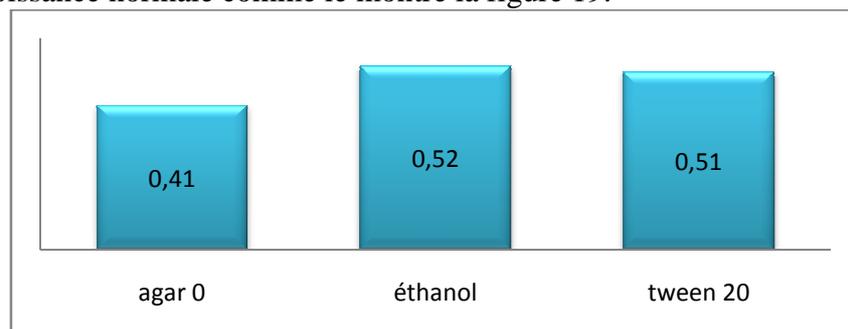


Figure 19 : Effet de l'éthanol et le tween 20 sur le Taux de croissance de *Salmonella*

L'analyse nous montre belle et bien que l'agar est un agent inhibiteur de la croissance microbienne et que l'éthanol et le tween 20 sont des activateurs de la croissance.

On remarque aussi que le temps de génération augmente en augmentant la concentration d'agar est diminuée avec les autres agents de dispersion ce qui confirme nos hypothèses.



I-3-c. Cinétique de croissance de la souche *Staphylococcus Aureus* :

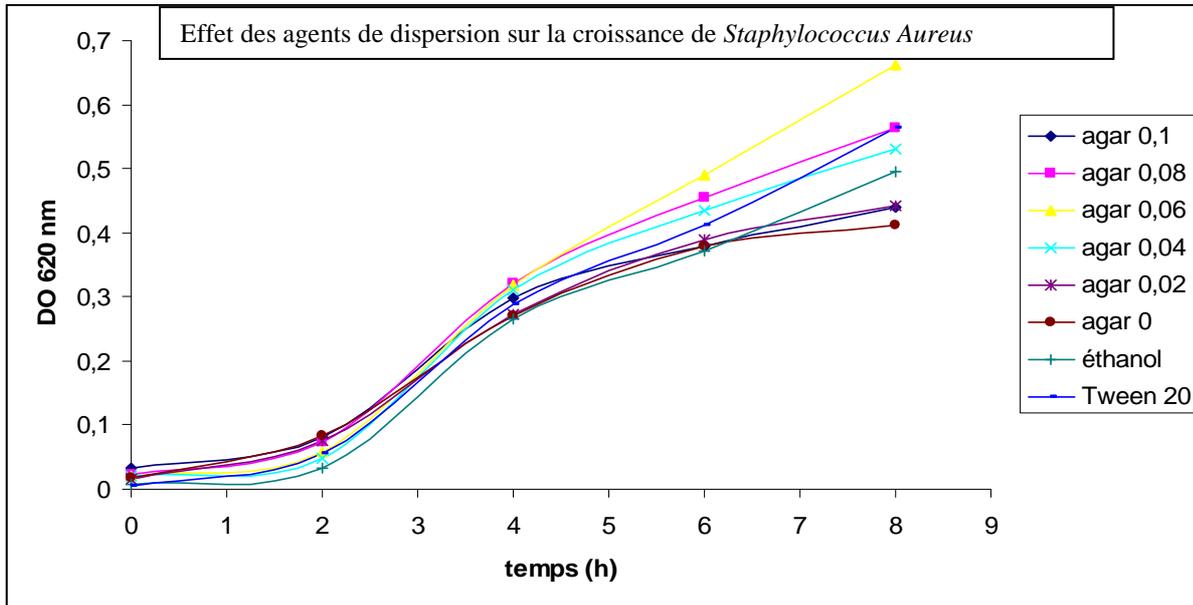


Figure 20 : Effet des agents de dispersion (agar, éthanol et tween 20) sur la croissance de la souche *Staphylococcus Aureus*

La figure 20 nous affiche la croissance de souche *Staphylococcus Aureus* avec tous ses stades de croissance vis-à-vis différents agents de dispersion. La croissance débute avec une phase d'adaptation qui dure en moyenne 1h45 min suivies d'une phase d'accélération qui dure 20 min. Après on remarque une montée exponentielle des courbes de croissances qui correspond à la phase de croissance exponentielle. On remarque après une phase transitoire de ralentissement ou le taux de croissance commence à diminuer.

L'étude des courbes de croissance de *Staphylococcus Aureus* vis-à-vis l'agar, l'éthanol et le tween 20 nous permet de juger que l'agar est un agent inhibiteur de la croissance et que les l'éthanol et le Tween 20 sont des agents activateurs de la croissance microbienne. Pour mieux comprendre le phénomène le tableau 22 nous montre la variation du taux de croissance et le temps de génération en fonction des agents de dispersion

Tableau 22 : Taux de croissance et Temps de génération de *Staphylococcus Aureus* en fonction des agents de dispersion

Milieu	agar 0,1	agar 0,08	agar 0,06	Agar 0,04	agar 0,02	agar 0	éthanol	tween 20
μ (h ⁻¹)	0,19	0,24	0,23	0,2	0,34	0,34	0,36	0,49
G (min)	218,89	173,29	180,82	207,94	122,32	122,32	115,52	84,88

Le taux de croissance de la souche *Staphylococcus Aureus* diminue avec une tendance linéaire et proportionnelle aux concentrations d'agar, ce qui est illustré sur la figure 21.

Effet des différentes concentrations d'Agar sur le Taux de croissance de *Staphylococcus aureus*

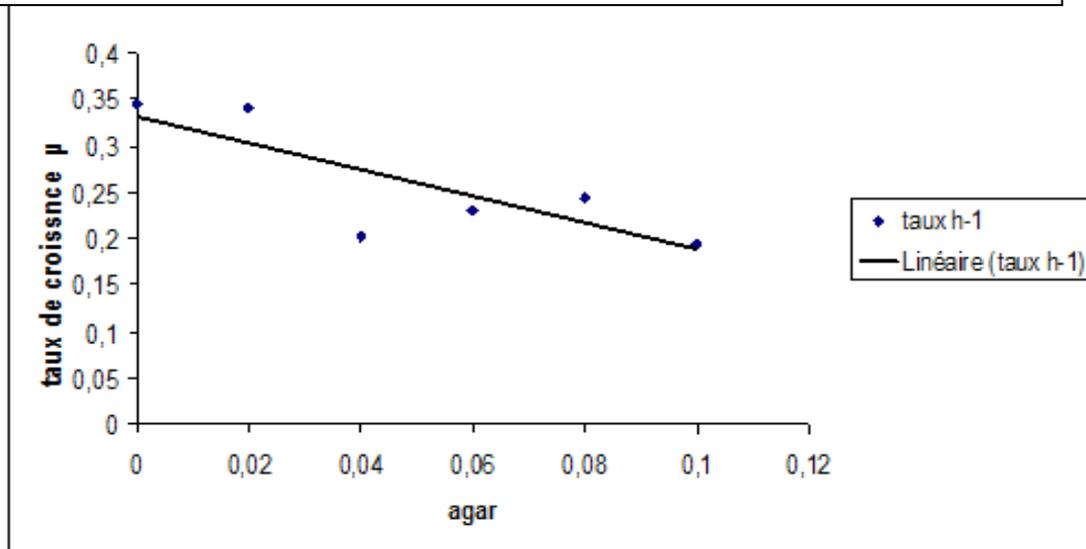


Figure 21 : Effet des différentes concentrations d'Agar sur le Taux de croissance de *Staphylococcus Aureus* (modèle linéaire)

Le taux de croissance de la souche *Staphylococcus Aureus* augmente vis-à-vis l'éthanol et le tween 20 par rapport à une croissance normale comme le montre la figure 22.

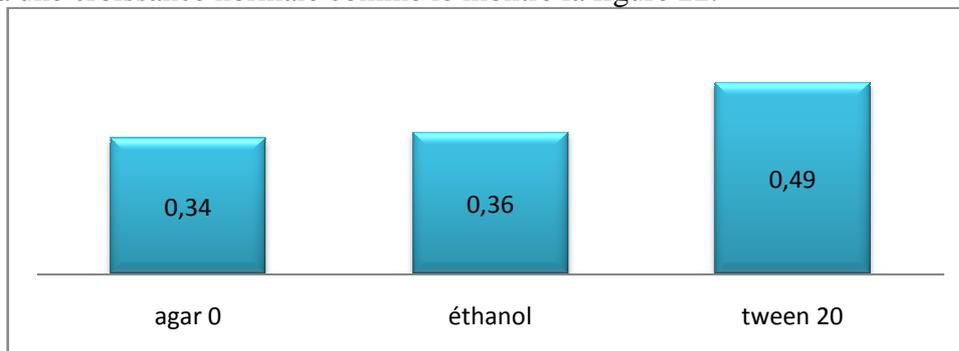


Figure 22 : Effet de l'éthanol et de tween 20 sur le Taux de croissance de *Staphylococcus Aureus*

L'analyse nous montre belle et bien que l'agar est un agent inhibiteur de la croissance microbienne et que l'éthanol et le tween 20 sont des activateurs de la croissance.

On remarque aussi que le temps de génération augmente en augmentant la concentration d'agar est diminuée avec les autres agents de dispersion ce qui confirme nos hypothèses.

a-4. Conclusion des cinétiques de croissance :

Les traitements sont réalisés sur les trois souches (*Escherichia Coli*, *Staphylococcus Aureus* et *Salmonella*) appartenant à différentes positions de la taxonomie bactérienne. *Escherichia* et *Salmonella* sont des bactéries à Gram négatif et *Staphylococcus* est une bactérie à Gram positif. Ces trois souches ont été isolées, caractérisées et identifiées au sein du laboratoire d'épidémiologie de Fez. Leur choix est fondé sur la possibilité de les traiter ultérieurement par les huiles essentielles car elles présentent une résistance large aux antibiotiques. Ces trois souches sont responsables de la



non-conformité microbiologique des denrées alimentaires exprimée par les toxi-infections alimentaires.

L'étude effectuée pour les trois souches nous permet de visualiser les courbes de croissances avec leurs différentes phases de croissance principales, on remarque ainsi une altération du taux de croissance au niveau de la phase exponentielle. La variation du taux de croissance s'exprime par une diminution et une augmentation selon le type de l'agent de dispersion.

La diminution du taux de croissance est due à l'agent de dispersion l'agar avec ses différentes concentrations. L'agar est un agent solidifiant, non biodégradable et qui contient des inhibiteurs de la croissance. (L'étude de la nature des constituants inhibiteurs est en cours aux seins du laboratoire)

L'augmentation du taux de croissance est due aux agents de dispersion « l'éthanol et le tween 20 ». A des faibles concentrations l'éthanol et le tween 20 actives le métabolisme oxydatif des bactéries et deviennes une source de Carbone supplémentaire et malgré la toxicité dans la phase de latence les bactéries s'adaptent et orientent leur métabolisme vers la croissance.

III-1-b. Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles par la méthode des plans d'expérience:

Dans la première partie de cette étude, nous avons constaté que l'agar est inhibiteur de la croissance bactérienne alors que l'éthanol et Tween 20 sont des activateurs. Nous avons gardé l'agar comme agent de dispersion car il va dans le même sens d'inhibition que les huiles essentielles, quoiqu'il donne une surestimation de l'effet d'inhibition.

b-1.Evaluation de l'effet des huiles essentielles et de l'agar sur *Escherichia Coli* :

b-1-1.Effet de l'agar et de l'huile essentielle de la plante *Thymus Vulgaris* sur la souche

Escherichia Coli: Plan d'expérience 1

Tableau 23: Valeurs des coefficients de réponse et fonction de réponse du plan d'expérience 1

b0	0,135
b1	-0,015
b2	-0,14
b1b2	-0,03
Fonction de réponse	$Y=0,135-0,015X_1-0,14X_2-0,03X_1X_2$

De ce tableau on constate que l'agar (b1) à un effet négatif sur la croissance évaluée en taux de croissance μ . L'Huile essentielle *Thymus Vulgaris* a un effet négatif sur la croissance. L'interaction b12 suit la même direction

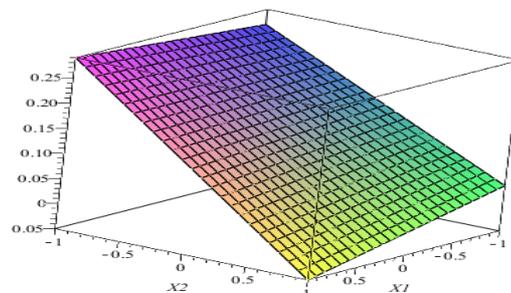
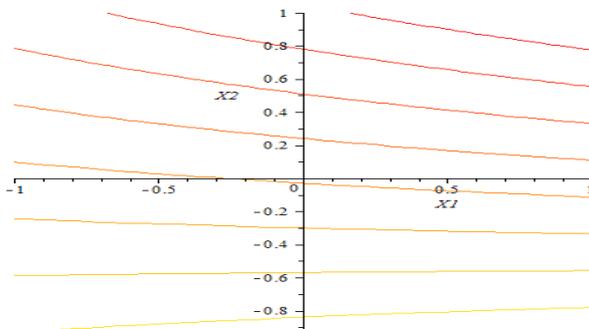




Figure 23 : Courbes d'isoreponse et représentation 3D de la fonction de réponse du plan d'expérience 1

Le taux de croissance est minimale $<-0,05>$ quand le volume de l'huile est maximal et la concentration de l'agar est maximale.

b-1-2. Effet de l'agar et de l'huile essentielle de la plante Origanum Vulgar sur la souche Escherichia Coli: plan d'expérience 2

Tableau 24: Valeurs des coefficients de réponse et fonction de réponse du plan d'expérience 2

b0	-0,01025
b1	0,03825
b2	0,06675
b1b2	-0,01475
Fonction de réponse	$Y = -0,010 + 0,038X_1 + 0,066X_2 - 0,014X_1X_2$

De ce tableau on constate que l'agar (b1) à un effet positif sur la croissance évaluée en taux de croissance μ . L'Huile essentielle d'*Origanum Vulgar* a un effet positif sur la croissance. L'interaction b12 a un effet négatif.

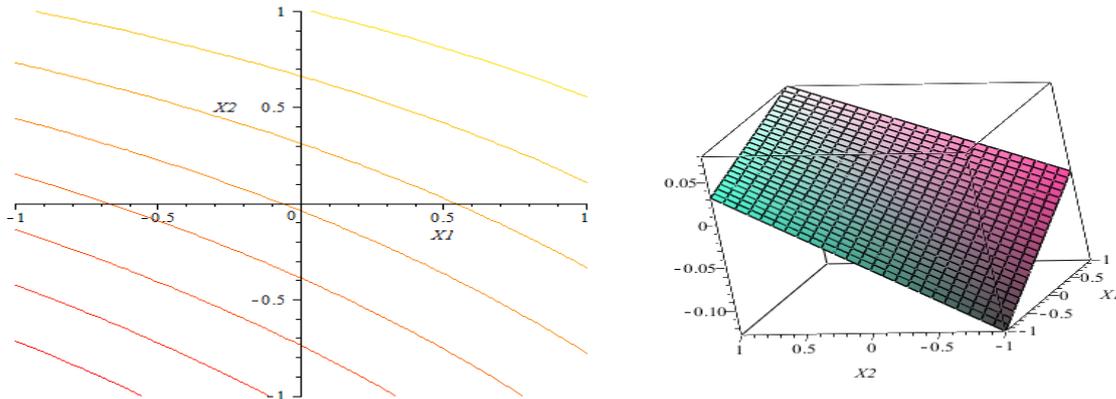


Figure 24 : Courbes d'isoreponse et représentation 3D de la fonction de réponse du plan d'expérience 2

Le taux de croissance est minimal $<-0,4>$ lorsque la concentration de l'agar est minimale et le volume de l'huile essentielle est minimale.

b-1-3. Effet de l'agar et de l'huile essentielle de la plante Cymbopogon Citratus sur la souche Escherichia Coli : plan d'expérience 3

Tableau 23: Valeurs des coefficients de réponse et fonction de réponse du plan d'expérience 3

b0	-0,12
b1	0,04
b2	-0,04
b1b2	-0,035
Fonction de réponse	$Y = -0,12 + 0,04X_1 - 0,04X_2 - 0,035X_1X_2$



De ce tableau on constate que l'agar (b1) à un effet positif sur la croissance évaluée en taux de croissance μ . L'Huile essentielle *Cymbopogon Citrate* a un effet négatif sur la croissance. L'interaction b12 suit la même direction.

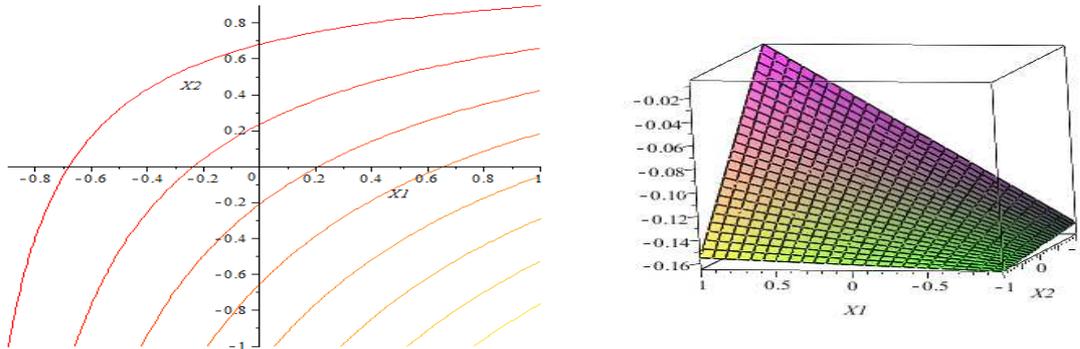


Figure 25 : Courbes d'isoreponse et représentation 3D de la fonction de réponse du plan d'expérience 3

Le taux de croissance est minimal $\langle -0,16 \rangle$ quand la concentration de l'agar est minimale et le volume de l'huile essentielle est maximal.

b-1-4. Effet de l'agar et de l'huile essentielle de la plante Rosmarinus officinalis sur la souche Escherichia Coli : plan d'expérience 4

Tableau 24: Valeurs des coefficients de réponse et fonction de réponse du plan d'expérience 4

b0	0,25
b1	0,04
b2	-0,11
b1b2	0,06
Fonction de réponse	$Y=0,25+0,04X1-0,11X2+0,06X1X2$

De ce tableau on constate que l'agar (b1) à un effet positif sur la croissance évaluée en taux de croissance μ . L'Huile essentielle de *Rosmarinus Officinalis* a un effet négatif sur la croissance. L'interaction b12 a un effet positif.

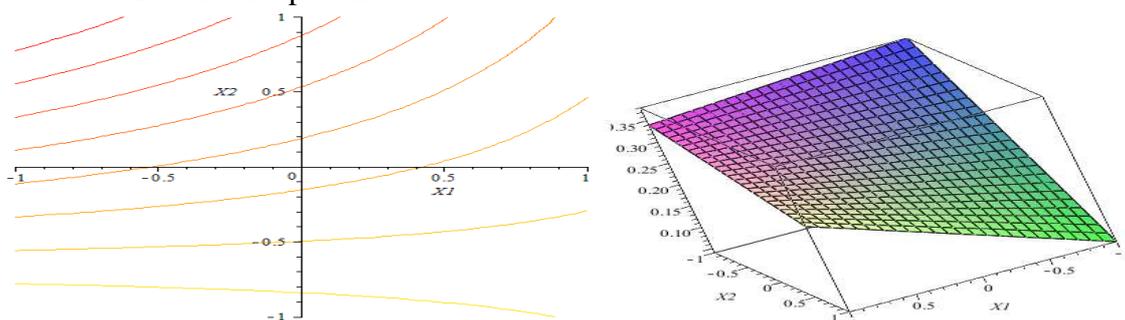


Figure 26 : Courbes d'isoreponse et représentation 3D de la fonction de réponse du plan d'expérience 4

Le taux de croissance est minimal $\langle 0,05 \rangle$ quand la concentration de l'agar est minimale et le volume de l'huile essentielle est maximal.



b-1-5. Effet de l'agar et de l'huile essentielle de la plante *Thymus Saturéioïdis* sur la souche *Escherichia Coli* : plan d'expérience 5

Tableau 25: Valeurs des coefficients de réponse et fonction de réponse du plan d'expérience 5

b0	0,05
b1	0,007
b2	0,01
b1b2	0,02
Fonction de réponse	$Y=0,05+0,007X_1+0,01X_2+0,02X_1X_2$

De ce tableau on constate que l'agar (b1) à un effet positif sur la croissance évaluée en taux de croissance μ . L'Huile essentielle de *Thymus Saturéioïdis* a un effet positif sur la croissance. L'interaction b12 suit la même direction

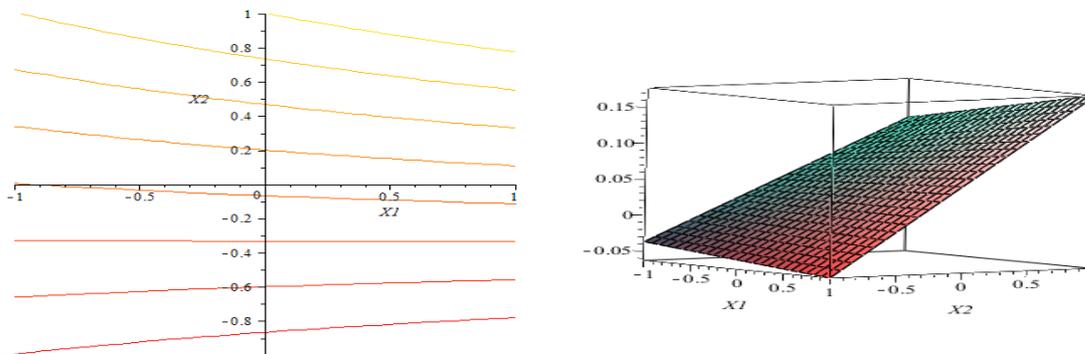


Figure 27 : Courbes d'isoreponse et représentation 3D de la fonction de réponse du plan d'expérience 5

Le taux de croissance est minimal $<-0,06>$ quand la concentration de l'agar est maximale et le volume de l'huile essentielles est minimal.

b-1-6. Conclusion des plans d'expérience d'E. Coli vis-à-vis les HE:

Tableau 28 : Récapitulatif des fonctions de réponse des huiles essentielles vis-à-vis E .Coli

HE	b0	b1	b2	b1b2	Fonction de réponse
<i>Thymus vulgaris</i>	0,135	-0,015	-0,14	-0,03	$Y=0,135-0,015X_1-0,14X_2-0,03X_1X_2$
<i>Origanum Vulgar</i>	-0,010	0,038	0,066	0,014	$Y=-0,010+0,038X_1+0,066X_2+0,014X_1X_2$
<i>Cymbopogon Citratus</i>	-0,12	0,04	-0,04	0,035	$Y=-0,12+0,04X_1-0,04X_2+0,035X_1X_2$
<i>Rosmarinus Officinalis</i>	0,25	0,04	-0,11	0,06	$Y=0,25+0,04X_1-0,11X_2+0,06X_1X_2$
<i>Thymus Saturéioïdis</i>	0,05	0,007	0,01	0,02	$Y=0,05+0,007X_1+0,01X_2+0,02X_1X_2$

On constate que les fonctions de réponses sont différentes les une des autres ce qui veut dire que l'agar, les huiles essentielles et leur interaction n'ont pas le même effet sur *Escherichia Coli*. On constate aussi que les conditions de diminution du taux de croissance d'E. Coli sont différentes. Le modèle mathématique de croissance exprimé avec l'effet de l'agar, des huiles essentielles et leur interaction est une fonction qui dépend de la concentration de l'agar, de la nature chimique des HE et leurs constituants. La fraction toxique des constituants des HE varie d'une HE à une autre ce qui explique la grande variabilité des coefficients de la fonction de réponse évaluée en taux de



croissance. Ainsi par analogie avec les antibiotiques chaque huile essentielle a un site d'attaque cellulaire spécifique.

b-2. Evaluation de l'effet des huiles essentielles et de l'agar sur *Salmonella Sp* :

b-2-1. Effet de l'agar et de l'huile essentielle de la plante *Thymus Vulgaris* sur la souche *Salmonella Sp* : plan d'expérience 6

Tableau 29: Valeurs des coefficients de réponse et fonction de réponse du plan d'expérience 6

b0	-0,004
b1	0,027
b2	0,037
b1b2	-0,01
Fonction de réponse	$Y = -0,004 + 0,027X_1 + 0,037X_2 - 0,01X_1X_2$

De ce tableau on constate que l'agar (b1) à un effet positif sur la croissance évaluée en taux de croissance μ . L'Huile essentielle de *Thymus Vulgaris* a un effet positif sur la croissance. L'interaction b12 a un effet négatif.

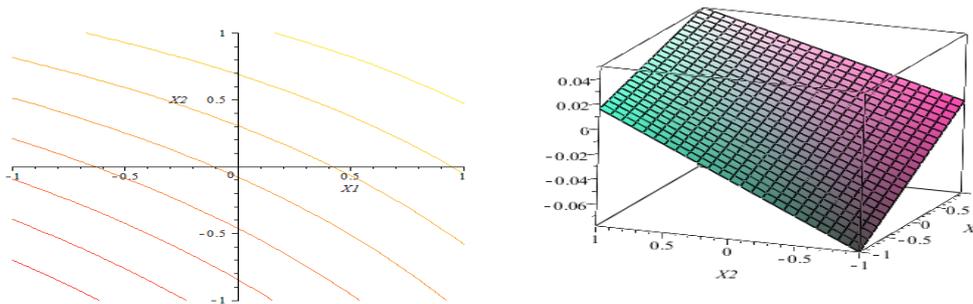


Figure 28 : Courbes d'isoreponse et représentation 3D de la fonction de réponse du plan d'expérience 6

Le taux de croissance est minimale $<-0,08>$ quand la concentration de l'agar est minimale et le volume de l'huile essentielle HE est minimal.

b-2-2. Effet de l'agar et de l'huile essentielle de la plante *Rosmarinus Officinalis* sur la souche *Salmonella sp* : plan d'expérience 7

Tableau 30: Valeurs des coefficients de réponse et fonction de réponse du plan d'expérience 7

b0	0,088
b1	-0,006
b2	-0,029
b1b2	0,010
Fonction de réponse	$Y = 0,088 - 0,006X_1 - 0,029X_2 + 0,010X_1X_2$

De ce tableau on constate que l'agar (b1) à un effet négatif sur la croissance évaluée en taux de croissance μ . L'Huile essentielle de *Rosmarinus Officinalis* a un effet négatif sur la croissance. L'interaction b12 a un effet positif.

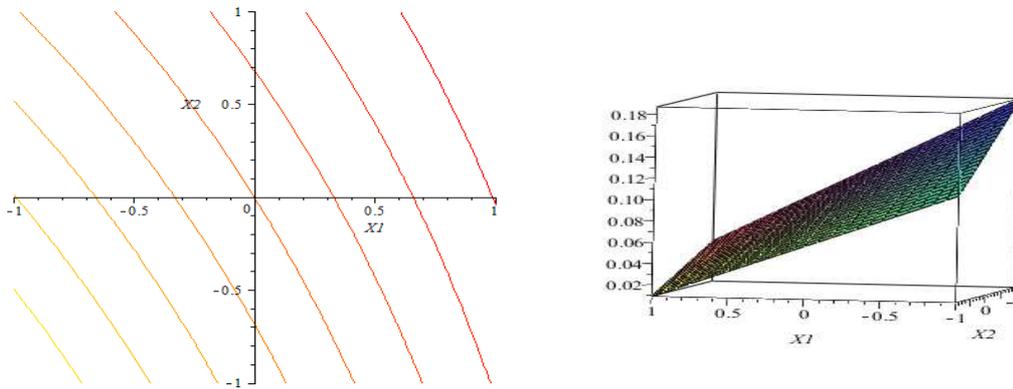


Figure 29: Courbes d'isoreponse et représentation 3D de la fonction de réponse du plan d'expérience 7

Le taux de croissance est minimal $<0,01>$ quand la concentration de l'agar est maximale et le volume de l'huile essentielle est maximal.

b-2-3 Effet de l'agar et de l'huile essentielle de la plante Thymus Saturéioïdis sur la souche Salmonella Sp: plan d'expérience 8

Tableau 31: Valeurs des coefficients de réponse et fonction de réponse du plan d'expérience 8

b0	0,05
b1	0,03
b2	0,01
b1b2	0,03
Fonction de réponse	$Y = 0,05 + 0,03X_1 + 0,01X_2 + 0,03X_1X_2$

De ce tableau on constate que l'agar (b1) à un effet positif sur la croissance évaluée en taux de croissance μ . L'Huile essentielle de *Thymus Saturéioïdis* a un effet positif sur la croissance. L'interaction b12 suit la même direction

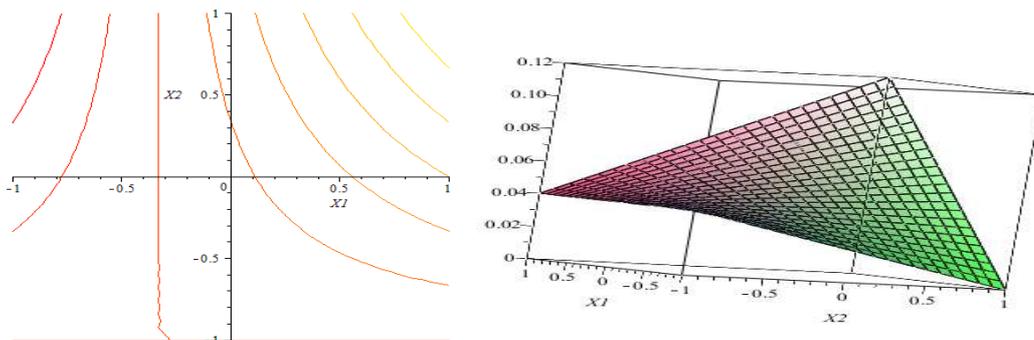


Figure 30 : Courbes d'isoreponse et représentation 3D de la fonction de réponse du plan d'expérience 8

Le taux de croissance est minimal $<0>$ quand la concentration de l'agar est minimale et le volume de l'huile essentielle est maximal.

b-2-4 Conclusion sur les plans d'expériences de salmonella Sp vis-à-vis les HE :

Tableau 32 : Récapitulatif des fonctions de réponse des huiles essentielles vis-à-vis Salmonella Sp



HE	b0	b1	b2	b1b2	Fonction de réponse
Thymus Vulgaris	-0,004	0,027	0,037	-0,01	$Y = -0,004 + 0,027X_1 + 0,037X_2 - 0,01X_1X_2$
Rosmarinus Officinalis	0,088	-0,006	-0,029	0,010	$Y = 0,088 - 0,006X_1 - 0,029X_2 + 0,010X_1X_2$
Thymus Saturioïdis	0,05	0,03	0,01	0,03	$Y = 0,05 + 0,03X_1 + 0,01X_2 + 0,03X_1X_2$

On constate que les fonctions de réponses sont différentes les une les autres ce qui veut dire que l'agar, les huiles essentielles et leur interaction n'ont pas le même effet sur *Salmonella Sp*. On constate aussi que les conditions de diminution du taux de croissance de *Salmonella Sp* sont différentes.

Le modèle mathématique de croissance exprimé avec l'effet de l'agar, des huiles essentielles et leur interaction est une fonction qui dépend de la concentration de l'agar, de la nature chimique des HE et leurs constituants. La fraction toxique des constituants des HE varie d'une HE à une autre ce qui explique la grande variabilité des coefficients de la fonction de réponse évaluée en taux de croissance. Ainsi par analogie avec les antibiotiques chaque huile essentielle a un site d'attaque cellulaire spécifique

b-3. Evaluation de l'effet des huiles essentielles et de l'agar sur *Staphylococcus*

Aureus:

b-3-1. Effet de l'agar et de l'huile essentielle de la plante *thymus vulgaris* sur la souche *Staphylococcus Aureus* : plan d'expérience 9

Tableau 33: Valeurs des coefficients de réponse et fonction de réponse du plan d'expérience 9

b0	-0,47
b1	0,005
b2	0,075
b1b2	-0,26
Fonction de réponse	$Y = -0,47 + 0,005X_1 + 0,075X_2 - 0,26X_1X_2$

De ce tableau on constate que l'agar (b1) à un effet positif sur la croissance évaluée en taux de croissance μ . L'Huile essentielle de *Thymus Vulgaris* a un effet positif sur la croissance. L'interaction b12 a un effet négatif.

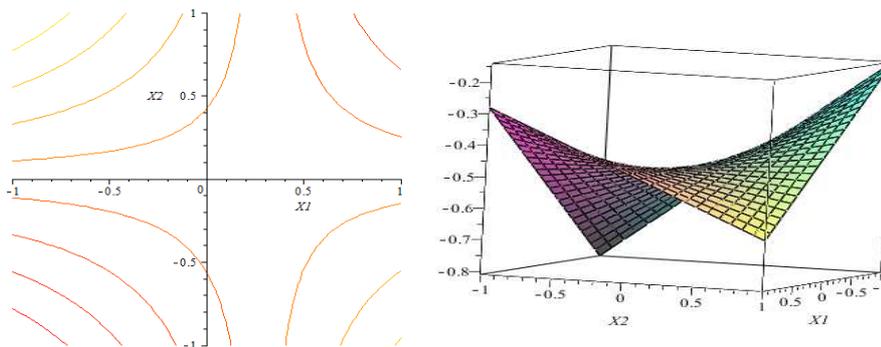


Figure 31 : Courbes d'isoreponse et représentation 3D de la fonction de réponse du plan d'expérience 9



Le taux de croissance est minimal <-0,8> lorsque la concentration d'agar est minimale et le volume de l'huile essentielle est minimal.

b-3-2. Effet de l'agar et de l'huile essentielle de la plante Rosmarinus Officinalis sur la souche Staphylococcus Aureus : plan d'expérience 10

Tableau 34 : Valeurs des coefficients de réponse et fonction de réponse du plan d'expérience 10

b0	0,105
b1	-0,065
b2	-0,12
b1b2	0,02
Fonction de réponse	$Y=0,105-0,065X_1-0,12X_2+0,02X_1X_2$

De ce tableau on constate que l'agar (b1) à un effet négatif sur la croissance évaluée en taux de croissance μ . L'Huile essentielle de *Rosmarinus Officinalis* a un effet négatif sur la croissance. L'interaction b12 a un effet positif.

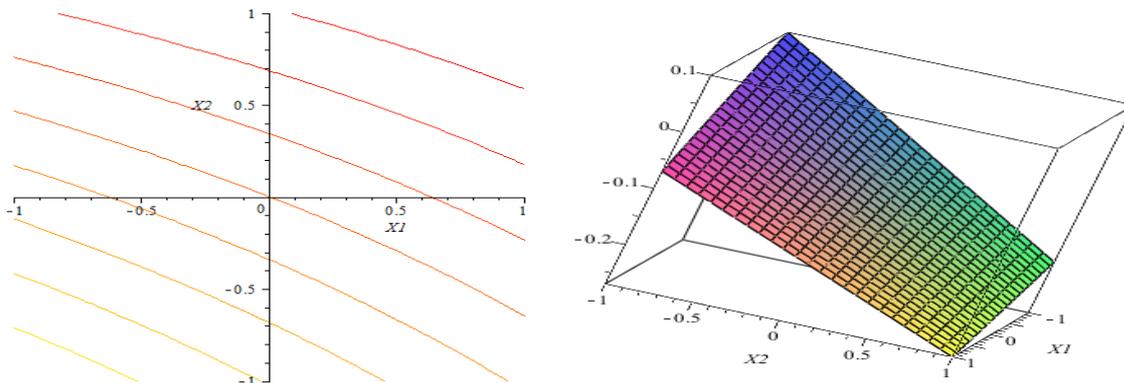


Figure 32 : Courbes d'isoreponse et représentation 3D de la fonction de réponse du plan d'expérience 10

Taux de croissance est minimale <-0,3> quand la concentration de l'agar est maximale et le volume de l'huile essentielle est maximal.

b-3-3. Effet de l'agar et l'huile essentielle de la plante Thymus Saturéioïdis sur la souche Staphylococcus Aureus : plan d'expérience 11

Tableau 35: Valeurs des coefficients de réponse et fonction de réponse du plan d'expérience 11

b0	-0,005
b1	0,02
b2	0



b1b2	0
Fonction de réponse	$Y = -0,005 + 0,02X_1$

De ce tableau on constate que l'agar (b1) à un effet positif sur la croissance évaluée en taux de croissance μ . L'Huile essentielle de *Thymus Saturéioidis* a un effet nul sur la croissance. L'interaction b12 suit la même direction.

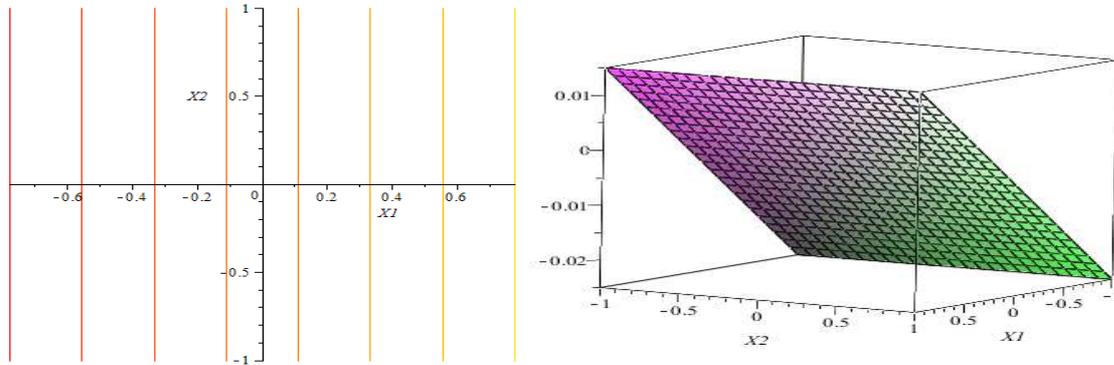


Figure 33 : Courbes d'isoreponse et représentation 3D de la fonction de réponse du plan d'expérience 11

Le taux de croissance est minimal $<-0,025>$ quand la concentration de l'agar est minimale et le volume de l'huile essentielle est minimal.

b-3-3 Conclusion sur les plans d'expériences de Staphylococcus aureus vis-à-vis les HE

Tableau 36 : Récapitulatif des fonctions de réponse des huiles essentielles vis-à-vis *Staphylococcus Aureus*

HE	b0	b1	b2	b1b2	Fonction de réponse
Thymus Vulgaris	-0,47	0,005	0,075	0,26	$Y = -0,47 + 0,005X_1 + 0,075X_2 + 0,26X_1X_2$
Rosmarinus Officinalis	0,105	-0,065	-0,12	0,02	$Y = 0,105 - 0,065X_1 - 0,12X_2 + 0,02X_1X_2$
Thymus Saturéioidis	-0,005	0,02	0	0	$Y = -0,005 + 0,02X_1$

On constate que les fonctions de réponses sont différentes les une les autres ce qui veut dire que l'agar, les huiles essentielles et leur interaction n'ont pas le même effet sur *Staphylococcus Aureus*. On constate aussi que les conditions de diminution du taux de croissance de la souche *Staphylococcus Aureus* vis-à-vis les huiles essentielles sont différentes.

Le modèle mathématique de croissance exprimé avec l'effet de l'agar, des huiles essentielles et leur interaction est une fonction qui dépend de la concentration de l'agar, de la nature chimique des HE et leurs constituants. La fraction toxique des constituants des HE varie d'une HE à une autre ce qui explique la grande variabilité des coefficients de la fonction de réponse évaluée en taux de croissance. Ainsi par analogie avec les antibiotiques chaque huile essentielle a un site d'attaque cellulaire spécifique.



III-2. Etude de l'effet des huiles essentielles en milieu solide : Méthode des disques d'agar:

Dans un premier temps nous avons testé la méthode des disques en papier, les résultats n'étaient pas satisfaisants à causes de la différence massive et visuelle suivie des auréoles d'inhibition sur les boîtes de Pétris. La sortie massive des huiles essentielles fait déplacer les cellules ce qui crée une nuance sur l'activité réelle des huiles essentielles avec la méthode des disques en papier. La preuve du problème de diffusion se manifeste par la forme géométrique des auréoles d'inhibitions qui sont non homogènes et irrégulières et non reproductibles. Ce qui nous a poussé à éliminer cette méthode non pratique et innover une méthode stable et qui assure une diffusion continue, homogène et sans déplacement des cellules. Dans cette optique nous avons élaboré et créé une méthode adéquate pour standardiser l'élaboration des aromagrammes sous forme de kit de disque contenant des quantités précises et variables des huiles essentielles. Avec cette méthode nous sommes parvenu à déposer 1,5 µl de l'HE avec précision chose qui est impossible avec la méthode des disques en papier

Les résultats des diamètres d'inhibition des disques gélosés imprégnés de 1,5 µl de chaque huile essentielle vis-à-vis les souches testées sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 37 : diamètre d'inhibition des huiles essentielles vis-à-vis les souches testées

N.B : le diamètre en Cm

HE\Souche	Escherichia Coli	Salmonella Sp	Staphylococcus Aureus
<i>Thymus vulgaris L</i>	3,2	1	3,2
<i>Rosmarinus officinalis L</i>	0	1,2	1
<i>Ammi Visnaga</i>	0	0	1
<i>Cymbopogon citratus</i>	1,6	1,6	2
<i>Origanum vulgare</i>	1,4	2,8	1,2
<i>Thymus Saturéioïdis</i>	1	4	2

On remarque que *Thymus vulgaris*, *Cymbopogon citratus*, *Origanum Vulgar* et *Thymus Saturéioïdis* ont un large spectre d'action, elles agissent sur toutes les souches bactériennes mais avec des diamètres différents. *Rosmarinus Officinalis* est une huile essentielle spécifique à la souche *Salmonella Sp* et *Staphylococcus Aureus* alors qu'*Ammi visnaga* est spécifique à la souche *Staphylococcus Aureus*. *Thymus saturéidis* représente le plus grand diamètre <4 Cm> vis-à-vis *Salmonella* et *Thymus vulgaris* représente à son tour les plus grands diamètres vis-à-vis *E. coli* <3,2 Cm> et *Staphylococcus Aureus* < 3,2 Cm>.



Conclusion générale :

Dans ce sujet les efforts ont été déployés dans un premier temps pour l'extraction, la caractérisation et l'identification des huiles essentielles de certaines espèces, et dans un deuxième temps pour l'évaluation de l'activité des huiles essentielles extraites sur les souches responsables des TIA et des TIAC.

Dans le premier volet dédié à l'extraction des huiles essentielles des espèces « *Thymus vulgaris*, *Origanum Vulgar*, *Ammi Visnaga*, *Rosmarinus Officinalis*, *Thymus Saturéioidis* et *Cymbopogon Citratus* » on remarque une large diversité de la composition chimique de ces derniers. Cette aromathèque des huiles essentielles dont on dispose a été exploitée dans le deuxième volet qui est focalisé sur l'évaluation de l'activité antibactérienne des HE sur les souches *Escherichia Coli*, *Salmonella Sp* et *Staphylococcus Aureus*.

Cette étude s'est heurtée initialement à des difficultés d'évaluations de l'activité antibactérienne des huiles essentielles. Pour remédier à cette situation nous avons fait appel à des améliorations techniques et méthodologiques.

L'aspect méthodologique amélioré a ciblé l'agent de dispersion avec l'étude de son effet unique ou combiné avec les huiles essentielles par la méthode des plans d'expériences. Cette dernière a montré que les modèles mathématiques de croissance varient en fonction de la matrice chimique des huiles essentielles, de la souche testée et de la concentration de l'agent de dispersion.

L'aspect Technique a ciblé l'amélioration de la technique de diffusion par création de disques à base d'agar imprégnés d'huile essentielle et contenant des volumes variables et maîtrisés.

Recommandations et perspectives :

Sur le plan fondamental de cette étude préliminaire nous recommandons vivement la révision de toutes les méthodologies expérimentales d'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles que ce soit en milieu liquide ou en milieu solide. Sur le plan pratique nous recommandons l'évaluation de l'effet de tous les agents de dispersions sur la croissance bactérienne avant leurs utilisations.

En perspective la création d'une nouvelle technique d'évaluation de l'activité antibactérienne reproductible et non couteuse.



Bibliographie :

- (1) : OMS, 2002. Stratégie mondiale de l'OMS pour la salubrité des aliments : une alimentation à moindre risque pour une meilleure santé.
- (2) : **Benkaddour, 2002**, Situation épidémiologique des toxi-infections alimentaires collectives au Maroc, 1992-2001. Séminaire national sur l'application du système HACCP dans le domaine de l'hygiène alimentaire. Ministère de la santé. Rabat.
- (3) : **Mohamed Belomaria, Ahmed Omar Touhami Ahami, Youssef Aboussaleh Bachir Elbouhali, Yahya Cherrah, Abdelmajid Soulaymani, 2006**. Origine environnementale des intoxications alimentaires collectives au Maroc: Cas de la région du Gharb Chrarda Bni Hssen
- (4): **NHS Choices, 2008**. Food poisoning
- (5): **Hahn, M. W., H. Lunsdorf, Q. Wu, M. Schauer, M. G. Hofle, J. Boenigk, and P. Stadler. 2003**. *Isolation of novel ultramicrobacteria classified as actinobacteria from five freshwater habitats in Europe and Asia*.
- (6): Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edition.
- (7): **Arnaud Delahaye**. La structure bactérienne.
- (8) : Chapitre 1 - Anatomie fonctionnelle des bactéries. Faculté de médecine Pierre Marie Curie
- (9) : **CEA - Octobre ,2005**. La structure bactérienne.
- (10) : **Jean-Christophe AUGUSTIN, 2005**. Modélisation de la croissance microbienne et gestion de la sécurité sanitaire des aliments.
- (11) : **Jean Paul Marie EUZÉBY, 2006**. Cours de Bactériologie Générale et Médicale destiné aux étudiants de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT).
- (12): **D.YALA, A.S. MERAD. MOHAMEDI, M.N. OUAR KORICH, 2001**. Classification et mode d'action des antibiotiques.
- (13) : **Ann Decoster**. Classification des Antibiotique
- (14) : **Michael Feusier, 2006-2007**. Classification des Antibiotiques.
- (15): **Patrice COURVALIN, 2007**. BACTERIAL ANTIBIOTIC RESISTANCE: COMBINATIONS OF BIOCHEMICAL AND GENETIC MECHANISMS.
- (16): **LOZNIEWSKI A., RABAUD C., 2010**. Infections associées aux soins: RESISTANCE BACTERIENNE AUX ANTIBIOTIQUES
- (17) : **Mohamed Bouhaloua, 2006**. MAROC-PAM N° 2 Février – Mars 2006 Lettre Bimensuelle d'Information sur les Plantes Aromatiques et Médicinales.
- (18) : **Saâdia ZRIRA, 2006**. MAROC-PAM N° 3 Février – Mars 2006 Lettre Bimensuelle d'Information sur les Plantes Aromatiques et Médicinales.
- (19) : **Rogério Santos Pereiraa, Tânia Cristina Sumitaa, Marcos Roberto Furlanb, Antonio Olavo, Cardoso Jorgec and Mariko Uenod, 2004**. Antibacterial activity of essential oils on microorganisms isolated from urinary tract infection.
- (20) : **Roger Randrianarivelo ,Samira Sarter , Eric Odoux , Pierre Brat , Marc Lebrun , Bernard Romestand ,Chantal Menut , Hanitriniaina Sahondra Andrianoelisoa , Marson Raherimandimby , Pascal Danthu , 2009**. Composition and antimicrobial activity of essential oils of *Cinnamosma fragrans*.
- (21): **Guy Alitonou, Félicien Avlessi, Valentin D.Wotto, Edwige Ahoussi, J. Dangou, Dominique C.K. Sohounhloué, 2003**. Composition chimique, propriétés antimicrobiennes et activités sur les tiques de l'huile essentielle d'*Eucalyptus tereticornis* Sm.



- (22) : Thèse Présentée en vue de l'obtention du Doctorat National Présentée Par **Khadija Rhayour, 2002**. *Sujet de thèse* : Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Esherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*
- (23) : Thèse Présentée en vue de l'obtention du Doctorat National Présentée Par : **Chami Fouzia, 2005**. *Sujet de thèse* : Evaluation *in vitro* de l'Action Antifongique des Huiles Essentielles d'Origan et de Girofle et de leurs Composés Majoritaires *in vivo* Application dans la Prophylaxie et le Traitement de la Candidose Vaginale sur des Modèles de Rat et de Souris Immunodéprimés
- (24) : **Idrissi Hassani, Hakim Alilou, Fatema Aghelas et Chebli Bouchra**. Composition des huiles essentielles et activité antifongique de quelques plantes du Sud marocain.
- (25): **Hedi Mighri, Hafedh Hajlaoui, Ahmed Akrouit , Hanen Najjaa , Mohamed Neffati, 2009**. Antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia herba-alba* essential oil cultivated in Tunisian arid zone.
- (26): **N. Bouzouita, M. Ben Halima, M. M. Chaabouni, 2008**. COMPOSITION CHIMIQUE ET ACTIVITÉS ANTIOXYDANTE, ANTIMICROBIENNE ET INSECTICIDE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE *Juniperus phoenicea*.
- (27) : **Celso Vataru Nakamura, Tania Ueda-Nakamura, Erika Bando, Abrahão Fernandes Negrão Melo, Díogenes Aparício Garcia Cortez, Benedito Prado Dias Filho, 1999**. Antibacterial Activity of *Ocimum gratissimum* L. Essential Oil.
- (28) : THÈSE En vue de l'obtention du DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE présentée par : **Chaker EL KALAMOUNI, 2010**. Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées.
- (29) : **H. Lamendin, G. Toscano, P. Requirand, 2004**. Phytothérapie et aromathérapie buccodentaires.
- (30) : **Ghislaine OLIVIER, 2007**. L'huile de Périlla.
- (31) : Département fédéral de l'intérieur DFI, Office fédéral de la santé publique OFSP, Unité de direction Protection des consommateurs, 2008. Les huiles essentielles.
- (32): **J. Masteli, I. Jerkovi, I. Blazevi, A. Radoni, L. Krstulovi, 2008**. Hydrodistillation-adsorption method for the isolation of water-soluble, non-soluble and high volatile compounds from plant materials.
- (33) : **FRANCINE BELLEAU, 1990**. ANALYSE DE L'HUILE ESSENTIELLE DULEDUM GROENLANDICUM RETZIUS.
- (34): **Firas A. Al-Bayati, 2007**. Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts.
- (35): **Petko Ivanov PENCHEV, 2010**. Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions.
- (36) : **Cassiano Busatta; Altemir José Mossi; Maria Regina Alves Rodrigues; Rogério Luis Cansian; José Vladimir de Oliveira, 2007**. EVALUATION OF *ORIGANUM VULGARE* ESSENTIAL OIL AS ANTIMICROBIAL AGENT IN SAUSAGE.
- (37): **O.O. Okoh, A.P. Sadimenko, A.J. Afolayan , 2009**. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods.
- (38): **Abdelghafour.T; El-Araki, 1997**. Pouvoir antimicrobien des huiles essentielles des plantes Aromatiques.
- (39): **Bachir Raho ghalem and Benali Mohamed, 2008**. Contribution to the Antiseptic Effect Study of Two *Eucalyptus* Species.



(40): **S.Bouhdid ET all, 2006.** Thymus essential oil: Chemical composition and in vitro antioxidant and antibacterial activities.

(41): **M. Kempf, M. Eveillard, F. Kowalczyk, E. Rossines, G. Panhelleux, M.-L. Joly-Guillou a, 2011.** Etude de la sensibilité de 224 bactéries isolées d'infections hospitalières vis-à-vis des composés JCA 250 et JCA 251 à base d'huiles essentielles issus de la recherche Aroma Technologies.

(42): **Morris J.A, Khetty A., 1978.** Antimicrobial activity of aromatic and essential oils.

(43): **Allegrini J, Simon De Buochberg M, 1972.** Une technique d'étude du pouvoir antibactérien des huiles essentielles.

(44) : **Remmal A, 1994.** Activités antibactérienne et antivirale des huiles essentielles d'origan, de girofle et de thym. Thèse Doctorat d'état ès-Sciences naturelles-Fac Dhar El Mehraz-Fès-Maroc.

(45) : **Thèse Présentée en vue de l'obtention du Doctorat National Présentée Par Errachidi.F, 1997.** Amélioration d'une souche de candida pour la production de l'éthanol

Remarque : les photos des plantes et des bactéries ont été prises du site web suivant :

WWW.Wikipedia.com