



Licence Es-Sciences et Techniques (LST)

# **TECHNIQUES D'ANALYSE ET CONTROLE DE QUALITE (TACQ)**

## **PROJET DE FIN D'ETUDES**

### ***EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTI-BACTERIENNE ET ANTI-OXYDANTE DE TROIS HUILES ESSENTIELLES : ROMARIN, MYRTE ET LE THYM***

**Présenté par :**

◆ **MOUTIE Loubna**

**Encadré par :**

◆ Pr. EL GHAZOUALI Ahmed (FST – Fès)

**Soutenu Le 09 Juin 2016 devant le jury composé de:**

- Pr. **EL GHAZOUALI Ahmed**
- Pr. **IHSSANE Bouchaib**
- Pr. **SAFFAJ Taoufiq**
- Pr. **LAMCHARFI El Hadi**

**Stage effectué laboratoire d'écologie fonctionnelle et  
environnement a FST Fès**

**Année Universitaire 2015 / 2016**

## Sommaire

<i>REMERCIEMENTS</i> .....	2
INTRODUCTION.....	5
<i>ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE</i> .....	6
I. Les plantes aromatiques et médicinales .....	8
1. Définition .....	8
2. Domaines d'application des plantes .....	8
3. Les PAM au Maroc .....	9
4. Description des plantes étudiées.....	9
II. Les huiles essentielles .....	12
1. Définition .....	12
2. Rôles et propriétés des huiles essentielles.....	13
3. Localisation des HE.....	13
4. Extraction des HE.....	13
5. Les méthodes de séparation, d'identification et de quantification .....	14
6. Composition chimique .....	14
7. Activités biologiques des huiles essentielles.....	15
<i>PARTIE EXPERIMENTALE</i> .....	18
I. Activité antibactérienne.....	19
1. Les microorganismes testés.....	19
2. Préparation des suspensions microbiennes.....	19
3. Mode opératoire .....	19
II. Activité antioxydant des huiles essentielles .....	19
1. Mode opératoire .....	19
III. Résultats .....	20
1. Composition chimique des trois huiles étudiées .....	20
2. Acticité antibactérienne.....	20
3. Acticité antioxydante.....	22
CONCLUSION .....	25

## Liste des figures

Figure 1 : <i>L'espèce Thymus vulgaris</i> .....	6
Figure 2 : <i>L'espèce Rosmarinus officinalis</i> .....	7
Figure 3 : <i>L'espèce Myrtus communis</i> .....	8
Figure 4 : <i>Graphes des pourcentages d'inhibition pour les trois huiles</i> .....	18
Figure 5 : <i>Détermination graphique de l'IC50 des trois huiles étudiées par méthode graphique</i> .....	19



## **REMERCIEMENTS**

*Tout d'abord, j'adresse mes sentiments de reconnaissance et gratitude à Monsieur Lahcen El ghadraoui d'avoir accepté de m'accueillir au sein de son laboratoire pendant la période de mon stage de fin d'étude.*

*je tiens aussi à remercier toute l'équipe du Laboratoire de Biotechnologie Microbienne et plus précisément Mlle Kawtar FIKRI BENBRAHIM , Mme Sara Lebrazi et Mme Marwa Chraibi pour leurs grande part de contribution dans la réalisation de ce travail.*

*Mes remerciements s'adressent à mon encadrant Monsieur Bouchaib IHSSANE , professeur la Faculté des Sciences et Techniques de Fés pour l'aide et les conseils concernant les missions évoquées dans ce rapport . J'exprime également ma gratitude à Monsieur Mouhcine FADIL pour le fait de partager sa compétence , et pour son aide dans la réalisation du travail.*

*Enfin , je tiens à exprimer ma satisfaction d'avoir pu travailler dans de bonnes condition matérielles et un environnement agréable.*

## INTRODUCTION

De tout temps, le règne végétal a offert à l'Homme des ressources essentielles à son alimentation, à son hygiène et sa santé. Depuis les temps les plus anciens, les parfums de ces mêmes végétaux sont associés à des rites mystiques, artistiques et esthétiques.

Aujourd'hui encore, diverses maladies sont traitées uniquement par les seules thérapies naturelles qui font appel non seulement aux plantes aromatiques, mais aussi à leurs huiles essentielles.

De nos jours, entre 20.000 et 25.000 plantes sont utilisées dans la pharmacopée humaine. 75% des médicaments ont une origine végétale et 25% d'entre eux contiennent au moins une molécule active d'origine végétale.

Il existe un grand nombre d'huiles essentielles connues dans le monde et plusieurs milliers d'entre elles ont été caractérisées. Cependant, de ce nombre, une faible proportion seulement présente un intérêt commercial. Cela s'explique par la composition chimique des huiles, les différentes utilisations possibles et leur coût de production.

La croissance de l'industrie pharmaceutique et le développement incessant de nouveaux produits médicaux synthétiques et biologiques plus efficaces n'ont pas réduit l'importance de l'utilisation des plantes médicinales. Au contraire, la croissance démographique dans le monde en développement et l'intérêt croissant manifesté au niveau des nations industrialisées ont considérablement augmenté la demande spécifique aux plantes aromatiques et médicinales et à leurs produits dérivés.

Dans le même sens, le Maroc dispose de ressources végétales mal exploitées, exporte une grande partie de sa production d'huiles essentielles et de molécules de grands intérêts avec une faible valeur ajoutée et importe des produits finis ou semi finis d'origine végétales de plus forte valeur ajoutée.

De nombreuses études ont été menées sur le potentiel antimicrobien des extraits de plantes et d'huiles essentielles et il est bien établi que de nombreuses huiles essentielles ont la capacité de lutter contre les souches pathogènes. Ceci nous a amené à nous pencher sur l'étude de l'activité antimicrobienne et anti oxydante des trois huiles essentielles le romarin, le thym et le myrte vis-à-vis deux bactéries et une levure qui causent des problèmes hygiéniques dans l'industrie alimentaire : *E. coli*, *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*.

Ainsi, ce travail a été réalisé au laboratoire d'écologie fonctionnelle et environnement en collaboration avec des membres du laboratoire de biotechnologie microbienne dans le cadre

de projet de fin d'étude licence. La première partie de ce rapport comporte une investigation bibliographique dans laquelle les connaissances liées aux huiles essentielles, leurs divers modes d'extractions et leurs activités biologiques sont abordés. Dans la partie expérimentale nous avons décrit les protocoles opératoires élaborés dans l'évaluation de l'activité biologique des huiles ainsi que les résultats obtenus et leur discussion.



***ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE***

## **I. Les plantes aromatiques et médicinales**

### **1. Définition**

Les plantes aromatiques et médicinales (PAM) sont un ensemble de plantes utilisé en cuisine et en phytothérapie pour les arômes qu'elles dégagent et leurs huiles essentielles que l'on peut extraire. Ces plantes aromatiques se trouvent dans la nature à l'état sauvage sont utilisées depuis au moins 7 000 ans avant notre ère par les Hommes et sont à la base de la phytothérapie.

### **2. Domaines d'application des plantes**

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie : en alimentation, en cosmétologie et en pharmacie. Parmi ces composés, on retrouve dans une grande mesure les métabolites secondaires qui se sont surtout illustrés en thérapeutique. La pharmacie utilise encore une forte proportion de médicaments d'origine végétale et la recherche trouve dans les plantes des molécules actives nouvelles, ou des matières premières pour la semi-synthèse.

Il y a eu donc un réveil vers un intérêt progressif pour l'utilisation des plantes médicinales dans les pays développés comme dans les pays en voie de développement. En effet, les herbes fines guérissent sans effet secondaire défavorable. Ainsi, une recherche de nouvelles drogues est un choix normal.

Plusieurs utilisations peuvent être attribuées aux plantes aromatiques et médicinales, Ainsi, les PAM sont utilisées en alimentation dans les boissons, les colorants. Aussi, Les épices et les herbes aromatiques utilisées dans l'alimentation sont pour une bonne part responsables des plaisirs de la table.

En parallèle, les utilisations de substances issues des plantes en médecine en tant que médicament pour l'homme sont diverses, nous citons comme exemple en urologie, dermatologie, gastrites aiguës, toux, ulcères d'estomac, laxatifs, sommeil et désordres nerveux, en systèmes cardiovasculaires, en drogues immunostimulantes, antispasmodiques et anti-inflammatoires contre le diabète, en activité antioxydante et en activité antimicrobienne. Par ailleurs, les PAM sont aussi utilisés en agriculture comme pesticides biologique, en cosmétique comme des produits de beauté, d'hygiène, parfums.



### **3. Les PAM au Maroc**

Le caractère orographique original du Maroc lui attribue des conditions pédoclimatiques très diversifiées et favorables pour le développement d'une flore riche et variée comprenant un potentiel important en PAM souvent endémiques. Le Maroc, un des pays de la Méditerranée, possède un véritable réservoir phytogénétique avec 41 écosystèmes et 7000 espèces végétales, dont 4500 espèces de plantes vasculaires. Dans cette diversité floristique, 600 espèces sont réputées pour leur usage aromatique et en médecine traditionnelle. Toutefois, seules 280 plantes sont actuellement exploitées. Le Maroc est l'un des pays méditerranéens ayant une longue tradition médicinale et un savoir-faire traditionnel à base de plantes médicinales. L'exploitation du potentiel des PAM est devenue un secteur important et prometteur pour le pays. En effet, il exporte environ l'équivalent de 300 millions de dirhams en PAM sous différentes formes et environ 165 millions de dirhams d'HE, soit un total d'environ 465 millions de dirhams.

### **4. Description des plantes étudiées**

#### **4.1. Le thym : *Thymus vulgaris* L.**

*Thymus vulgaris* (figure 1), est un sous arbrisseau, vivace, touffu et très aromatique de 7-30 cm de hauteur, d'un aspect grisâtre ou vert grisâtre. Ses tiges ligneuses à la base, herbacées supérieurement sont presque cylindriques. Ces tiges ligneuses et très rameuses sont regroupées en touffe ou en buisson très dense. Ses feuilles sont très petites, ovales, à bord roulé en dessous à nervures latérales distinctes, au pétiole extrêmement court et blanchâtre à leur face inférieure. Ses fleurs sont presque roses ou presque blanches, font de 4 à 6 mm de longueur, sont pédicellées et réunies ordinairement au nombre de trois à l'aisselle des feuilles supérieures. Le limbe du calice est bilabié, un peu bossu. La corolle de taille variable, un peu plus longue que le calice, mais la partie tubulaire de la corolle ne dépasse pas celle du calice, les étamines sont incluses. La période de la floraison commence en mai-début juin.



**Figure 1.** L'espèce *Thymus vulgaris*

La classification de *Thymus vulgaris* est illustrée dans le tableau 1. Ce classement se réfère à la classification botanique antérieure.

**Tableau 1.** Classification botanique de *Thymus vulgaris*

Règne	<i>Plantes</i>
Sous règne	<i>Plantes vasculaires</i>
Embranchement	<i>Spermaphytes</i>
Sous embranchement	<i>Angiospermes</i>
Classe	<i>Dicotylédones</i>
Sous classe	<i>Dialypétales</i>
Ordre	<i>Labiales</i>
Famille	<i>Lamiaceas</i>
Genre	<i>Thymus</i>
Espèce	<i>Thymus vulgaris</i>

#### **4.2. Le romarin : *Rosmarinus officinalis* L.**

*Rosmarinus officinalis* (figure 2) est un arbrisseau, dont la tige pouvant atteindre deux mètres est couverte d'une écorce grisâtre. Elle se divise en nombreux rameaux opposés, tortueux. Les fleurs sont bleues pâles à bleues violacées, visibles de janvier à mai. Elles sont groupées à l'extrémité des rameaux, à la base des feuilles. Les feuilles opposées décussées insérées sur une tige à section carrée, étroite, lancéolée, linéaire, à bords roulés en dessous, sont vertes et luisantes à la face supérieure. Le fruit, ovoïde, est entouré par un calice persistant, sec est constitué de quatre akènes (tetrakène), il attire les insectes pour assurer la pollinisation.





**Figure 2.** L'espèce *Rosmarinus officinalis*

La classification de *Rosmarinus officinalis* est mentionnée dans le tableau 2.

**Tableau 2.** Classification botanique de *Rosmarinus officinalis*

Règne	<i>Plantae</i>
Sous règne	<i>Tracheobionta</i>
Embranchement	<i>Spermaphytes</i>
Sous embranchement	<i>Angiospermes</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous classe	<i>Astéridés</i>
Ordre	<i>Lamiales</i>
Familles	<i>Lamiaceae</i>
Genre	<i>Rosmarinus</i>
Espèce	<i>Rosmarinus officinalis</i>

#### **4.3. Le Myrte : *Myrtus communis* L.**

*Myrtus communis* (figure 3) est un arbuste de un à deux mètres de hauteur se présentant en buissons denses d'un vert brillant. Il se remarque par ses fleurs blanches très ouvertes et ses nombreuses étamines en touffe ébouriffée. La plante renferme de nombreuses poches sécrétrices surtout au niveau des feuilles. Ces dernières sont ovoïdes lancéolées, 2 à 3 fois plus longues que larges, à nervation pennée persistante, opposée, à très court pétiole, coriace et d'un vert brillant. Les fleurs apparaissent au début de l'été, elles sont grandes 10-15 mm, solitaires sur un long pédoncule à l'aisselle des feuilles, très odorantes et pourvues à la base de bractées très petites, rapidement caduques.

Les fruits poussent à l'automne, ce sont des baies ovoïdes 6-8 mm noires bleuâtres à peau charnue, conservant à leur partie supérieure les restes du calice. Ces fruits sont comestibles, mais âpres et astringents.



Les rameaux sont de taille fine de couleur verte qui se transforme rapidement en brun orangé, pubescents dans leur jeunesse.



*Figure 3. L'espèce Myrtus communis*

La classification de *Myrtus communis* est illustrée dans le tableau 3.

*Tableau 3. Classification botanique de Myrtus communis*

Règne	<i>Plantae</i>
Sous-règne	<i>Tracheobionta</i>
Embranchement	<i>Magnoliophyta</i>
Sous-embranchement	<i>Magnoliophytina</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous-classe	<i>Rosidae</i>
Ordre	<i>Myrtales</i>
Famille	<i>Myrtaceae</i>
Genre	<i>Myrtus</i>
Espèce	<i>Myrtus communis</i>

## II. Les huiles essentielles

### 1. Définition

Les HE, essences ou huiles volatiles sont: "des produits de composition généralement assez complexe renfermant les principes volatiles contenus dans les végétaux et plus ou moins *modifiés* au cours de la préparation. Plus récemment, la norme AFNOR NFT 75-006 a donné la définition suivante d'une HE: "Produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par procédé mécanique, soit par distillation sèche".

## **2. Rôles et propriétés des huiles essentielles**

Le rôle des huiles essentielles dans la physiologie de la plante reste encore mal connu. Toutefois, les parfums émis jouent un rôle attractif pour les insectes pollinisateurs. De plus, en règle générale, les huiles essentielles constituent un moyen de défense naturel contre les insectes prédateurs et les microorganismes. Les substances émises sont dans ce dernier cas appelées « phytoalexines ». Ce type de toxine n'est produit qu'en cas d'infection et n'entre donc pas dans la composition d'une huile essentielle provenant d'une plante saine

## **3. Localisation des HE**

Les huiles essentielles sont produites dans des cellules glandulaires spécialisées recouvertes d'une cuticule. Elles sont alors stockées dans des cellules à huiles essentielles (*Lauraceae* ou *Zingiberaceae*), dans des poils sécréteurs (*Lamiaceae*), dans des poches sécrétrices (*Myrtaceae* ou *Rutaceae*) ou dans des canaux sécréteurs (*Apiaceae* ou *Asteraceae*). Elles peuvent aussi être transportées dans l'espace intracellulaire lorsque les poches à essences sont localisées dans les tissus internes.

## **4. Extraction des HE**

### **4.1. Techniques générales**

#### **i. Infusion**

L'eau bouillante est versée sur les feuilles ou sur les fleurs finement hachées pour qu'elles libèrent tout l'arôme et leur principe actif. On laisse infuser une dizaine de minutes.

#### **ii. Décoction**

La plante est mise dans l'eau froide et portée à ébullition. Cette méthode de transformation ne permet pas d'extraire autant de principes actifs que l'infusion, mais elle est adaptée aux racines et aux écorces pour lesquelles l'extraction est difficile.

#### **iii. Macération**

C'est l'action de laisser séjourner à froid dans un solvant organique une substance pour en extraire les constituants solubles.

#### **iv. La Technique de L'enfleurage**

En 1980, Lawrence a donné des indications précises sur cette technique. Cette dernière est employée en parfumerie. Elle est fondée sur l'affinité qui peut exister entre les corps gras et les HE. En effet, les HE sont absorbées par les corps gras, souvent à froid (enfleurage à froid) ou à l'état liquide par chauffage (enfleurage à chaud).

### **4.2. Les procédés de distillation**



Pratiquée sous ses différentes formes, la distillation est sans doute la méthode la plus employée pour extraire les essences des plantes ou des sécrétions résineuses. Il existe 3 procédés fondamentaux de d'extraction des huiles essentielles par distillation:

- La distillation à l'eau ou «hydrodistillation»
- La distillation à l'eau et à la vapeur ou «distillation à la vapeur humide»
- La distillation à la vapeur ou «distillation à la vapeur sèche».

La distillation réalisée sous alambic et l'hydrodistillation industrielle à feu nue sont parmi plusieurs techniques employées pour la distillation industrielle. Au laboratoire, il existe l'hydrodistillation assisté par micro-onde, celle assisté par ultra-son et le dispositif classique Clevenger.

## **5. Les méthodes de séparation, d'identification et de quantification**

### **5.1. Chromatographie en Phase Gazeuse / Spectrométrie de Masse**

La simplicité du couplage entre ces deux techniques, les progrès accomplis dans le traitement en temps réel du signal, la constitution de banques de données de spectres de masse et le développement des algorithmes de comparaison entre le spectre d'un composé inconnu avec ceux répertoriés dans la banque sont à l'origine de la généralisation de l'usage de la CPG/SM dans les laboratoires d'analyse des composés aromatiques.

La CPG sur colonne capillaire constitue une excellente méthode d'introduction de l'échantillon dans le spectromètre de masse. Ainsi, la colonne capillaire est directement couplée à la source d'ions permettant l'ionisation des constituants. Il existe deux modes d'ionisation : l'ionisation chimique (IC) et l'ionisation par impact électronique (IE). Ce dernier mode est le plus répandu, le seul qui permet une étude systématique de la structure des ions moléculaires et fragments formés.

## **6. Composition chimique**

Le nombre des molécules chimiquement différentes qui constituent une huile essentielle est variable. A côté des composés majoritaires, on retrouve des composés minoritaires et un certain nombre de constituants sous forme de traces.

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes et variables de constituants qui appartiennent, de façon quasi exclusive, à deux groupes :

- le groupe de terpénoïdes ;
- le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane.

La structure des composés des huiles essentielles est constituée d'un squelette hydrocarboné, constituant une chaîne plus ou moins longue. Sur ce squelette de base est souvent présent un



ou plusieurs sites fonctionnels semblables ou différents. La majorité des sites fonctionnels sont des sites oxygénés avec un ou plusieurs atomes d'oxygène, pour quelques groupes fonctionnels azotés ou soufrés.

## **7. Activités biologiques des huiles essentielles**

Les vertus des huiles essentielles 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 ont porté sur les activités antimicrobiennes et antioxydantes des huiles essentielles des plantes aromatiques. L'activité biologique d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique et les possibles effets synergiques entre ses composants. Sa valeur tient à l'intégralité de ses constituants et non seulement à ses composés majoritaires.

### **7.1. Activité antimicrobienne**

L'examen des données bibliographiques fait apparaître d'emblée la diversité des méthodologies utilisées pour mettre en évidence l'activité antibactérienne des huiles essentielles. Ainsi Les différents protocoles peuvent être classés selon le milieu dans lequel se fait la diffusion de l'huile essentielle et selon la nature du contact de l'huile essentielle avec le germe. La majorité de chercheurs ont employé une des trois analyses suivantes : diffusion sur disque, dilution d'agar et dilution de bouillon. Ces méthodes sont relativement rapides, peu coûteuses et n'exigent pas l'équipement de laboratoire sophistiqué ; cependant, elles ne sont pas sans inconvénients.

#### **i. Méthode de l'aromatogramme**

En plus de l'appellation méthode de l'aromatogramme, elle est appelée aussi technique de l'antibioaromatogramme, méthode de VINCENT ou méthode de diffusion dans la gélose (agar). Elle est particulièrement adaptée à l'étude de l'action antibactérienne. Elle permet de déterminer la sensibilité des différentes espèces bactériennes vis à vis de l'huile essentielle donnée. Elle peut être aussi adaptée pour tester d'autres agents antimicrobiens.

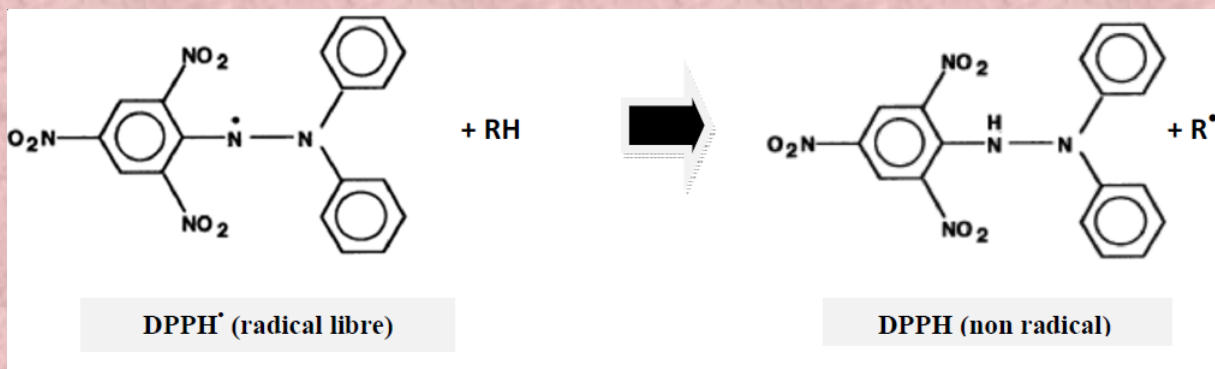
La méthode de l'aromatogramme consiste à utiliser des boites de Pétri contenant un milieu gélosé convenable (10-25mL), déjà solidifié et inoculé de la souche microbienne testée. Des disques en papier filtre, papier buvard ou Wattman (6-8mm), préalablement imprégnés de quantités connues d'HE (5-30 $\mu$ L), sont alors placés en surface de la gélose. Généralement, les micro-organismes seront classés susceptibles, intermédiaires ou résistants, selon le diamètre de la zone d'inhibition.

## 7.2. Activité antioxydante

La lutte contre l'oxydation des aliments représente donc un enjeu considérable pour les industriels alimentaires. Pour supprimer ou ralentir l'oxydation des lipides, deux voies sont envisageables : tenter de réduire les facteurs favorables à cette oxydation et/ou trouver un réactif qui ralentit l'oxydation : c'est le rôle de l'antioxydant. Ce dernier est défini comme une substance qui, à de faibles concentrations comparées à celles des substrats oxydables, prévient significativement ou retarde l'initiation du processus d'oxydation.

### i. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante

Les méthodes utilisées pour évaluer l'activité antioxydante des huiles essentielles sont relativement peu nombreuses et font intervenir en général la coloration ou la décoloration d'un réactif spécifique en présence d'agent antioxydant (huile essentielle). Selon la bibliographie, la méthode la plus utilisée est celle de la réduction du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) qui est un radical organique stable, coloré et centré sur l'azote (Blois, 1958). Le maximum de son absorption se situe vers 515 nm dans le méthanol et l'éthanol (Portes, 2008). Les antioxydants donneurs d'atome H (RH) sont capables de réduire DPPH•, ce qui conduit au 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH-H) et au radical R•. Le DPPH• a une couleur violette ou rouge pourpre mais cette couleur disparaît lorsqu'il est réduit par un capteur de radicaux.



### ii. Paramètres de calcul de l'activité antioxydante

#### • Pourcentage d'inhibition

L'inhibition du radical libre de DPPH en pourcentage I(%) est calculée de la manière suivante :

$$I(\%) = \frac{A_{\text{blanc}} - A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{blanc}}}$$

avec :

$A_{\text{blanc}}$  : Absorbance du blanc (contenant tous les réactifs excepté le composé d'essai)

$A_{\text{échantillon}}$  : Absorbance du composé d'essai.

- **Paramètre  $IC_{50}$**

Ce paramètre est défini comme la concentration d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical initiale de 50 %.



***PARTIE EXPERIMENTALE***

## **I. Activité antibactérienne**

### **1. Les microorganismes testés**

Le nombre de microorganismes testés, lors de cette étude est de trois : deux souches bactériennes (Gram+ et Gram-) et une levure, La souche Gram négatif représentée par *Escherichia coli* et la souche Gram-positif représentée par *Staphylococcus aureus* et la levure représentée par *Candida albicans*.

### **2. Préparation des suspensions microbiennes**

On a effectué un prélèvement des souches test, ces derniers ont été inoculés dans un bouillon nutritif et incubées à 37° C pendant 24h pour les bactéries et à 30° C pendant 24\*h pour les levures.

### **3. Mode opératoire**

Le test est effectué en cultivant les bactéries sur un milieu Muller Hinton et la levure sur une gélose Sabouraud. Chaque boîte de Pétri de 90mm a reçu 20 ml du milieu de culture et estensemencée avec 100µl de la suspension microbienne. Les disques stériles sont déposés à la surface du milieu; ces disques sont chargés de 5 µl d'HE à concentrations décroissantes d'huile essentielle (1/1, 1/10 - 1/25 - 1/50 -1/100- 1/200). La dilution et la solubilisation des huiles à été réalisé par le DMSO. Ensuite, ils ont été incubés, inversés à l'obscurité dans une étuve à une température de 37 C durant 24h pour les bactéries et à 25 C durant 48h pour la levure.

La sensibilité des différentes souches *vis-à-vis* des HE étudiées est classée suivant le diamètre d'inhibition(DI) selon les critères suivants: non sensible (-) pour  $DI \leq 8$  mm; sensible (+) pour 9-14 mm; très sensible (++) pour 15-19 mm et extrêmement sensible (+++) pour  $DI \geq 20$  mm

## **II. Activité antioxydant des huiles essentielles**

### **1. Mode opératoire**

L'activité antioxydante *in vitro* a été évaluée par la mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH (1,1- Diphenyl-2-picrylhydrazyl), une solution de DPPH a été préparée par solubilisation de 9 mg de DPPH dans 300 ml de méthanol. Ensuite, nous avons préparé des tubes de 1ml de différentes concentrations (500, 250, 125, 62.5, 31,25 µg/ml) de chaque huile à tester diluée par le méthanol. À chaque tube nous avons ajouté à 1 ml de la solution méthanolique de 0,0003% de DPPH déjà préparée. Le mélange réactionnel a été agité

vigoureusement. Après incubation de 30 min à l'obscurité et à température ambiante, les absorbances sont mesurées à 517 nm contre le blanc correspondant.

### III. Résultats

#### 1. Composition chimique des trois huiles étudiées

Les trois huiles de thym, Myrte et Romarin sont déjà identifiées en termes de composition chimiques par les membres du laboratoire d'écologies fonctionnelle et environnement. Le tableau 4 présente les composés majoritaires de chacune des trois huiles. Ainsi, nous relevons que l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* est composée principalement du thymol (37,24 %) accompagné d'autres constituants à des teneurs relativement plus basses notamment : le p-cymène (14,19 %), le  $\gamma$ -Terpinène (10,85 %) et le carvacrol (4,32 %). L'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* est composée essentiellement de : l' $\alpha$ -pinène (48,88 %), le 1,8 cinéole (33,6 %), le camphène (8,69 %). Finalement, l'huile essentielle de *Myrtus communis* est composée essentiellement du borneol (27,15 %), 1,8 cinéole (21,33 %),  $\alpha$ -pinène (11,09 %), camphène (9,49 %), myrtenyl acétate (6,45 %),  $\beta$ -caryophyllène (6,15 %), et du camphre (4,82 %).

**Tableau 4. Composés majoritaires des HE des trois plantes étudiées**

<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Rosmarinus officinalis</i>	<i>Myrtus communis</i>
Thymol (37,24 %)	$\alpha$ -pinène (48,88 %)	Borneol (27,15 %)
P-cymène (14,19 %)	1,8 cinéole (33,6 %)	1,8 cinéole (21,33 %)
$\gamma$ -terpinène (10,85 %)	Camphène (8,69 %)	$\alpha$ -pinène (11,09 %)
Carvacrol (4,32 %),	Camphre (2,68%)	Camphène (9,49 %)
		Myrtenyl acétate (6,45 %)
		$\beta$ -caryophyllène (6,15 %)
		Camphre (4,82 %)

#### 2. Activité antibactérienne

Les résultats du tableau 5 montrent que, quelles que soient la concentration utilisée pour les trois souches étudiées, c'est l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* qui donne les valeurs les plus élevées du diamètre d'inhibition, suivi par *Myrtus communis* et en dernière position nous trouvons l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*. Les résultats de l'activité enregistrée pour les trois souches étudiées peuvent être expliqués par la composition chimique



de l'huile essentielle utilisée. Ainsi, l'activité antibactérienne envers les deux bactéries traitées *vis-à-vis* de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* revient essentiellement à sa teneur élevée en composés ayant une forte activité antibactérienne tels que le thymol. L'activité de l'huile essentielle de *Myrtus communis* est due principalement aux composés ayant aussi une forte activité antibactérienne tels que le borneol et d'autres composés moyennement actifs tels que le 1,8-cineole et l' $\alpha$ -pinène. En fin, l'activité de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* utilisée revient aux composés majoritaires qui la constituent particulièrement le 1,8-cineole et l' $\alpha$ -pinène.

**Tableau 5. Criblage des activités antibactériennes données par les différentes concentrations des HE étudiées**

Souche	Solvant	Concentration	<i>Thymus vulgaris</i> (zoned'inhibition en mm)	<i>Rosmarinus officinalis</i> (zoned'inhibition en mm)	<i>Myrtus communis</i> (zoned'inhibition en mm)
<i>S. aureus</i>	0	HE pur	22±0,76	11±0,23	17±0,42
		Rapport 1/5	12,5±0,88	<b>9±0,11</b>	11±0,35
		Rapport 1/10	<b>9±0,18</b>	8.33±0,75	<b>9.3±0,62</b>
		Rapport 1/25	8.5±0,55	7.1±0,41	8±0,16
		Rapport 1/100	7.33±0,28	-	7±0,85
		Rapport 1/200	6.5±0,11	-	6,25±0,22
<i>E. coli.</i>	0	HE pur	17.5±0,72	15±0,16	16±0,88
		Rapport 1/5	<b>10±0,14</b>	<b>9.5±0,48</b>	<b>10±0,92</b>
		Rapport 1/10	8.5±0,85	8.2±0,	8.5±0,09
		Rapport 1/25	7.5±0,33	7±0,46	7.25±0,26
		Rapport 1/100	6.5±0,31	6,23±0,17	6.33±0,12
		Rapport 1/200	-	-	-
<i>C. albicans</i>	0	HE pur	15±0,82	13.5±0,93	14,68
		Rapport 1/5	<b>10±0,28</b>	<b>9±0,15</b>	<b>9.5±0,1</b>
		Rapport 1/10	8.5±0,88	8±0,46	8.33±0,33
		Rapport 1/25	7.33±0,35	7±0,85	7.25±0,63
		Rapport 1/100	6±0,53	6±0,18	6,5±0,35
		Rapport 1/200	-	-	-

Les résultats du tableau 5 indiquent aussi que la dilution 1/10 est celle qui donne une activité classée comme sensible pour la souche *S. aureus* pour les deux huiles de *Thymus vulgaris* et *Myrtus communis*, c'est-à-dire qu'elle est la plus petite concentration qui donne une sensibilité représentée par une zone d'inhibition comprise entre 9 et 14mm. Cependant, Pour l'huile du romarin la concentration qui donne une activité de sensibilité est celle de 1/5. Pour les deux souches *E. coli* et *C. albicans*, 1/5 est la concentration donnant une sensibilité pour les trois huiles étudiées.

Les résultats du tableau attestent que pour les trois souches étudiées, le solvant utilisé (DMSO) ne présente pas d'activité ce qui confirme que le choix de ce solvant est judicieux.

### 3. Acticité antioxydante

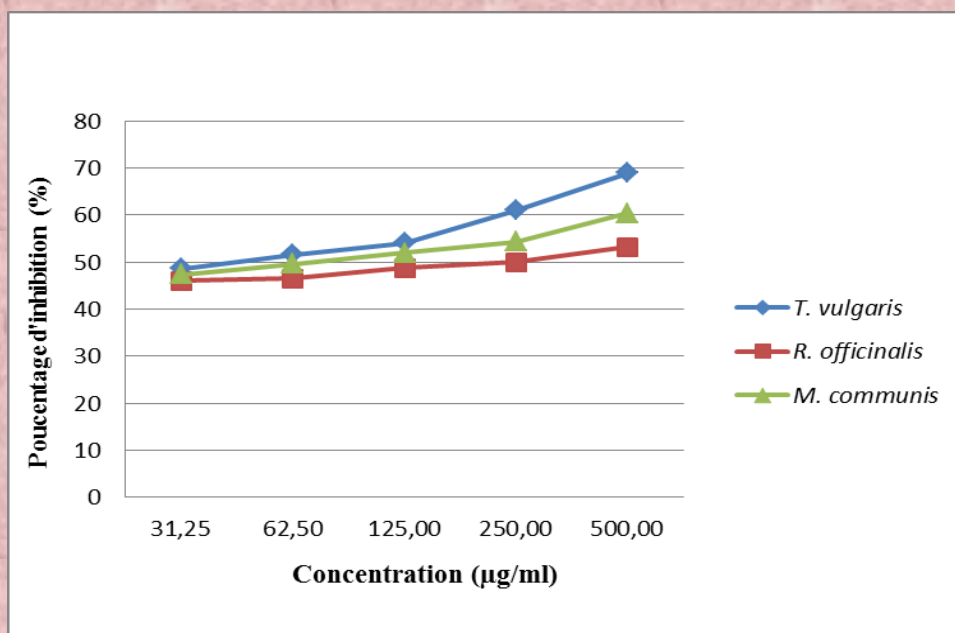
#### 3.1. Pourcentage d'inhibition des huiles

Le tableau 6 affiche les pourcentages d'inhibition observés obtenus lors du test de mesure de pourcentage d'inhibition du radical DPPH enregistrés pour les trois huiles de *Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis* et *Myrtus communis*.

**Tableau 6. Valeurs des pourcentages d'inhibition obtenues pour chacune des trois huiles**

Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	<i>Thymus vulgaris</i> (%)	<i>Rosmarinus officinalis</i> (%)	<i>Myrtus communis</i> (%)
31,25	48,61	46,05	47,33
62,50	51,54	46,54	49,6
125,00	54,08	48,74	51,92
250,00	60,94	49,92	54,28
500,00	68,16	53,23	60,12

Le graphe de la figure 4 illustre mieux ces les résultats Il semble que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration.



**Figure 4. Graphes des pourcentages d'inhibition pour les trois huiles essentielles de *Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*, *Myrtus communis* en fonction des concentrations**

#### 3.2. Détermination de l'indice IC50

La détermination des pourcentages d'inhibition  $IC_{50}$  des différentes huiles a été réalisée graphiquement sur les courbes de régression qui relient les pourcentages d'inhibition aux concentrations (figure 5).

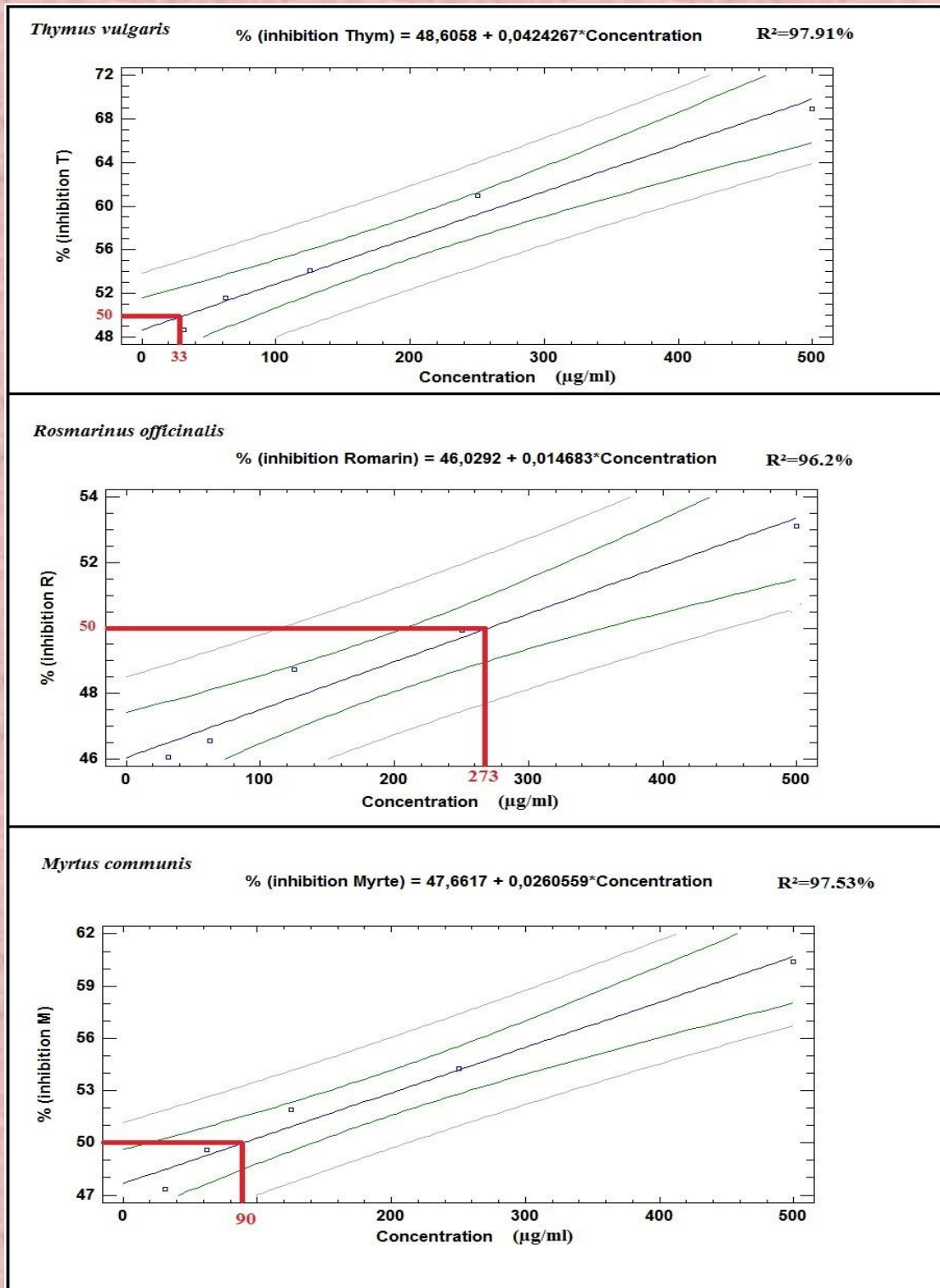


Figure 5. Détermination graphique de l' $IC_{50}$  des trois huiles étudiées par méthode graphique



Les trois valeurs de l'indice  $IC_{50}$  relatives aux trois huiles étudiées sont déterminées à partir des équations des droites de régression reliant les pourcentages d'inhibition avec les concentrations utilisées. Ainsi, nous avons fait le calcul suivant :

Pour l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* :

Nous avons l'équation suivante :

$$\% \text{ (inhibition Thym)} = 48,6058 + 0,0424267 * \text{La concentration}$$

Or

$$\text{La concentration} = \frac{\% \text{ (inhibition Thym)} - 48,60}{0,042}$$

Pour l'indice  $IC_{50}$ , la concentration correspond à la quantité de l'huile essentielle nécessaire pour inhiber 50% du réactif DPPH. Nous avons donc :

$$\text{La concentration} = \frac{50 - 48,60}{0,042} = 33 \mu\text{g/ml}$$

Par le même calcul, nous avons trouvé des valeurs de  $IC_{50}$  égale à 273  $\mu\text{g/ml}$  et 90  $\mu\text{g/ml}$  pour les deux huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* et *Myrtus communis* respectivement.

Ces résultats montrent que l'huile de Thym est celle qui a donné le plus grand  $IC_{50}$  avec une valeur de 33  $\mu\text{g/ml}$ . En deuxième position nous trouvons l'huile de Myrte avec une  $IC_{50}$  de 90  $\mu\text{g/ml}$  et en dernière position vient l'huile de romarin avec un  $IC_{50}$  de 273  $\mu\text{g/ml}$ .

D'une façon similaire à l'activité antibactérienne, l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* donne les meilleurs pourcentages d'inhibition parmi les trois huiles étudiées à toutes les concentrations. On note aussi que c'est la concentration de 500  $\mu\text{g/ml}$  qui donne le meilleur pourcentage d'inhibition pour les trois huiles. Ainsi, l'huile de *Thymus vulgaris* donne un pourcentage d'inhibition qui atteint 68,16% suivie par celle de *Myrtus communis* par 60,12% et en fin celle de *Rosmarinus officinalis* par 53,23%.

Étant donné que l'huile essentielle est un mélange des composés appartenant à des familles chimiques diverses, cette différence observée entre les trois huiles serait due à leur

composition chimique. Ainsi, la forte capacité de réduction des radicaux libres par l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* peut être due à son profil chimique, riches en phénols tel que le thymol. En effet, ces constituants phénoliques ont déjà prouvé leur fort pouvoir antioxydant. Les composés phénoliques, grâce à leurs propriétés d'oxydoréduction, agissent comme agents réducteurs, donneurs de l'hydrogène et de l'oxygène singulier. Les autres composés majoritaires possèdent aussi une activité antioxydante remarquable notamment le  $\gamma$ -terpinène, le p-cymène et le carvacrol. Pour l'huile de *Myrtus communis*, l'activité antioxydante est due à la présence de composé tel que le borneol, l' $\alpha$ -pinène, le 1,8 cinéole, et le mertenyl acétate connus par leur pouvoir antioxydant. En ce qui concerne l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*, son activité antioxydante est liée à sa teneur en produits tels que l' $\alpha$ -pinène et 1,8 cinéole et le camphre.

## CONCLUSION

Dans ce travail, nous avons procédé à l'étude de l'activité biologique des huiles essentielles de *Thymus vulgaris*, *Myrtus communis* et *Rosmarinus officinalis*. Les criblage des activité antibactérienne a permis de conclure que la 1/5 est la concentration qui donne une réponse classé comme sensible pour les deux souches *E. coli* et *C. albicans*. Concernant la souche *S. aureus*, elle est considérée comme sensible à la concentration 1/10 pour les deux huiles *Thymus vulgaris* et *Myrtus communis* et à la concentration 1/5 pour l'huile du romarin. Tenant compte de l'activité antioxydante, l'huile de thym a donné le meilleur résultat avec un  $IC_{50}$  de 33 $\mu$ g/ml suivi de l'huile de myrte avec un  $IC_{50}$  qui atteint 90 $\mu$ g/ml au moment où l'huile de romarin a donné la plus faible activité avec une valeur de 273 $\mu$ g/ml.

Cette étude nous a permis de conclure que l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* est la plus efficace biologiquement. Ceci revient à sa teneur en composés majoritaires à très grande activité comme le thymol et le carvacrol et d'autres composés moyennement actifs comme le p-cymène, et le  $\gamma$ -Terpinène. L'huile de *Myrtus communis* a présenté une activité intéressante proportionnellement à sa composition chimique riche en composés actifs biologiquement tels que le borneol, et d'autres moins actifs tels que 1,8 cinéole,  $\alpha$ -pinène. Cependant, l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* a présenté une activité moyenne liée essentiellement à sa composition chimique riche en  $\alpha$ -pinène et 1,8 cinéole. Ces résultats peuvent représenter une base de recherche sur la substitution des agents antimicrobien classiques par les extraits des plantes qui ne cessent de nous étonner par leur pouvoir mal exploité mais très prometteur.

**Profit de stage :**

Le mois de stage que j'ai passé au laboratoire d'écologie fonctionnelle et environnement m'a été très bénéfique du moment où j'ai appris beaucoup de chose notamment les principes à respecter et les règles à suivre pour s'intégrer dans la vie collective au sein d'une équipe de recherche de dimension pareil.

L'entente et l'entraide qui règne ont attiré mon attention et ça prouve que le travail de groupe est la base de tout succès.

Ce stage m'a permis d'approfondir mes connaissances et d'acquérir de nouvelles expériences ignorées.

Ce pendant j'avoue avoir gardé des souvenirs inoubliables de cette période de stage.

Enfin j'espère que le présent travail apporte bien une approche fidèle et atteint ce qui en est attendu.



# WEBGRAPHIE

[www.google.fr](http://www.google.fr)

[www.wikipedia.com](http://www.wikipedia.com)

[www.amazone.com](http://www.amazone.com)