



**Projet de Fin d'Etudes**

Licence Sciences et Techniques

Sciences Biologiques Appliquées et Santé

(LST-SBAS)

**Valorisation des déchets végétaux par la  
recherche de l'activité antibactérienne**

Présenté par : **Mlle FRAGOU BTISSAM**

Encadré par : **Pr. R. BENCHEIKH** (LBM2B ; FST Fès)

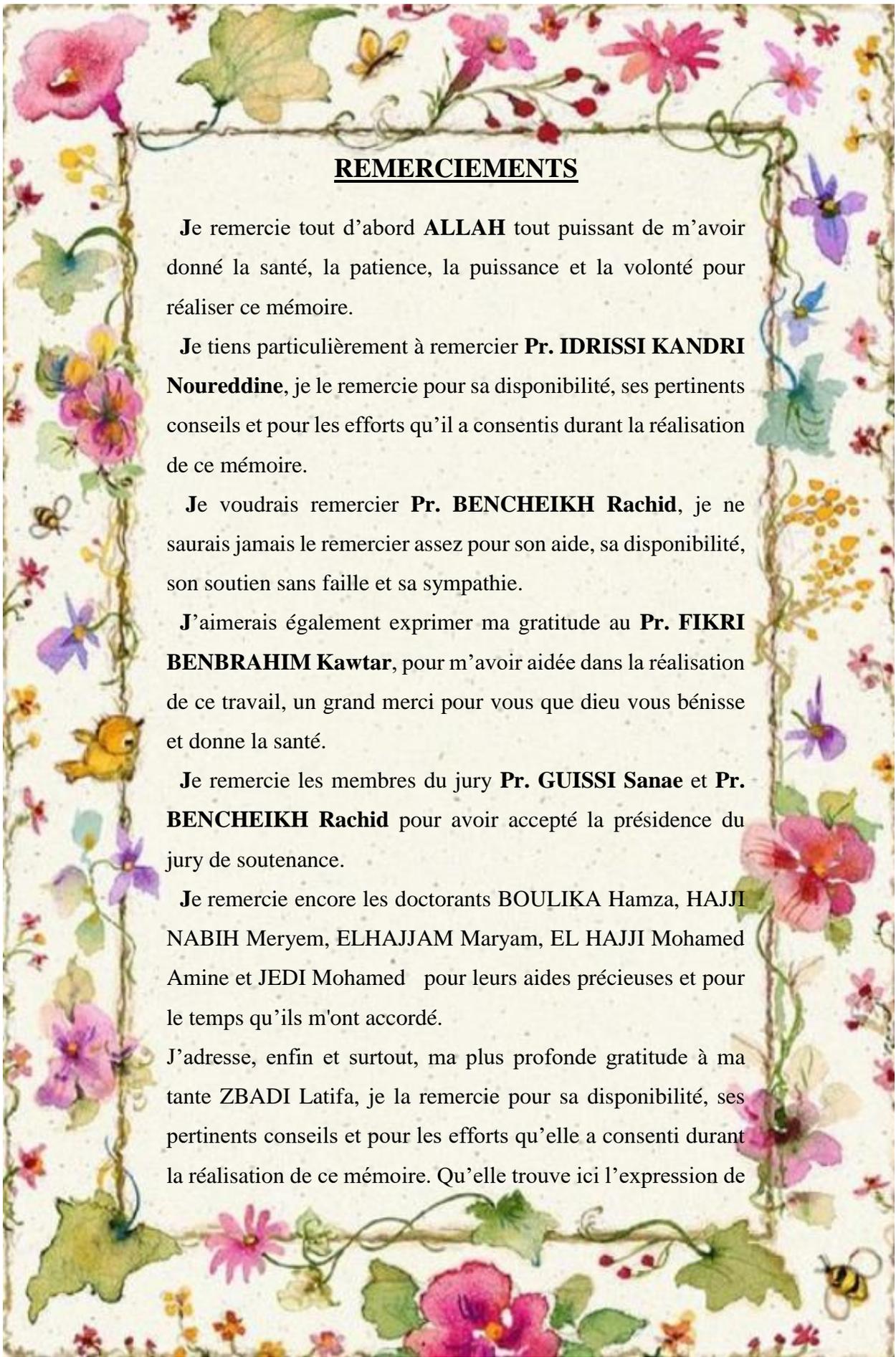
**Pr. N. IDRISSI KANDRI** (LSSC ; FST Fès)

Soutenu le : 06/07/2021

Devant le jury composé de :

- **Pr. GUISSI Sanae**
- **Pr. BENCHEIKH Rachid**
- **Pr. IDRISSI KANDRI Nouredine**

Stage effectué à : FST Fès/Laboratoire LSSC/LBM2B



## REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord **ALLAH** tout puissant de m'avoir donné la santé, la patience, la puissance et la volonté pour réaliser ce mémoire.

Je tiens particulièrement à remercier **Pr. IDRISSI KANDRI Nouredine**, je le remercie pour sa disponibilité, ses pertinents conseils et pour les efforts qu'il a consentis durant la réalisation de ce mémoire.

Je voudrais remercier **Pr. BENCHEIKH Rachid**, je ne saurais jamais le remercier assez pour son aide, sa disponibilité, son soutien sans faille et sa sympathie.

J'aimerais également exprimer ma gratitude au **Pr. FIKRI BENBRAHIM Kawtar**, pour m'avoir aidée dans la réalisation de ce travail, un grand merci pour vous que dieu vous bénisse et donne la santé.

Je remercie les membres du jury **Pr. GUISSI Sanae** et **Pr. BENCHEIKH Rachid** pour avoir accepté la présidence du jury de soutenance.

Je remercie encore les doctorants **BOULIKA Hamza**, **HAJJI NABIH Meryem**, **ELHAJJAM Maryam**, **EL HAJJI Mohamed Amine** et **JEDI Mohamed** pour leurs aides précieuses et pour le temps qu'ils m'ont accordé.

J'adresse, enfin et surtout, ma plus profonde gratitude à ma tante **ZBADI Latifa**, je la remercie pour sa disponibilité, ses pertinents conseils et pour les efforts qu'elle a consenti durant la réalisation de ce mémoire. Qu'elle trouve ici l'expression de

## DÉDICACE

À MES PARENTS QUI M'ONT SOUTENU ET ENCOURAGÉ DURANT CES ANNÉES D'ÉTUDES.

QU'ILS TROUVENT ICI LE TÉMOIGNAGE DE MA PROFONDE RECONNAISSANCE.

À MES FRÈRES, MA TANTE ET CEUX QUI ONT PARTAGÉ AVEC MOI TOUS LES MOMENTS D'ÉMOTION LORS DE LA RÉALISATION DE CE TRAVAIL. ILS M'ONT CHALEUREUSEMENT SUPPORTÉ ET ENCOURAGÉ TOUT AU LONG DE MON PARCOURS.

À MA FAMILLE, MES PROCHES ET À CEUX QUI ME DONNENT DE L'AMOUR ET DE LA VIVACITÉ.

À TOUS MES AMIS SAÏD ET AHLAM QUI M'ONT TOUJOURS ENCOURAGÉ, ET À QUI JE SOUHAITE PLUS DE SUCCÈS.

À TOUS CEUX QUE J'AIME.

**MERCI !**



## Liste des abréviations

<b>CMI</b>	Concentration minimale inhibitrice
<b>CMB</b>	Concentration minimale bactéricide
<b>DMSO</b>	Diméthylsulfoxyde
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<b>K</b>	Kanamycine
<b>LB</b>	Luria-Bertani
<b>MH</b>	Muller-Hinton
<b>OMS</b>	Organisation mondiale de la santé
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<b>T-</b>	Témoin négatif
<b>Tw</b>	Tween
<b>VIH</b>	Virus de l'immunodéficience humaine

## Liste des figures

Figures	Pages
Figure 4 : Effet des produits AA et AB sur <i>E. coli</i>	12
Figure 5 : Effet des produits AA et AB sur <i>Staphylococcus aureus</i>	12
Figure 6 : Effet des produits AA et AB sur <i>Staphylococcus aureus</i>	13
Figure 7 : Effet du produit GD sur <i>Staphylococcus aureus</i>	13
Figure 8 : Effet des huiles AP et BB sur <i>E. coli</i>	14
Figure 9 : Effet des huiles AP et BB sur <i>Staphylococcus aureus</i>	14
Figure 10 : Etude d'une microplaque révélant la CMI	15
Figure 11 : Détermination de la CMB de l'huile AP	16
Figure 12 : Détermination de la CMB de l'huile BB	17
Figure 13 : Détermination de la CMB du produit GD	18

## Liste des tableaux

Tableaux	Pages
Tableau 1 : Source et nature de production des déchets	2 et 3
Tableau 2 : Détermination de la CMI	9 et 10
Tableau 3 : Diamètre d'inhibition de <i>E. coli</i> et de <i>staphylococcus aureus</i>	15

# Table des matières

Introduction :	1
Etude bibliographique :	2
1. Déchets :	2
1.1 Définitions des déchets :	2
1.2 Concept de déchets :	2
a. Ancien concept :	2
b. Nouveau concept :	2
2. Typologie des déchets :	2
a. Classification selon l'origine des déchets :	2
b. Classification selon la dangerosité des déchets :	2
c. Sources et natures des déchets :	2
3. Impacts des déchets :	3
3.1 Impact sur l'environnement :	3
3.2 Impact sur la santé :	3
3.3 La gestion des déchets :	4
4. Bactéries :	4
4.1 <i>Escherichia coli</i> :	4
4.2 <i>Staphylococcus aureus</i> :	4
4.3 Antibactérien :	4
4.4 Comment un antibiotique peut-il agir sur les bactéries :	4
4.5 Méthodes utilisées dans les études des effets antibactériens :	5
a. Méthode du puits ou cylindre :	5
b. Méthode de diffusion ou des disques en milieu solide :	5
4.6 Définition de la CMI :	5
4.7 Définition de la CMB :	5
Matériel et méthodes	7
1. Matériel :	7

1.1	Echantillonnage :.....	7
1.2	Microorganismes utilisés :.....	7
2.	Méthodes :.....	7
2.1	Préparation du milieu : .....	7
2.2	Repiquage des microorganismes :.....	7
2.3	Test des huiles :.....	7
a.	Préparation de l'inoculum :.....	7
b.	Préparation des huiles AP et BB :.....	8
c.	Préparation des disques :.....	8
d.	Application du test :.....	8
2.4	Test des produits secondaires des traitements des déchets végétaux :.....	8
a.	Préparation des produits secondaires des traitements des déchets végétaux : .....	8
2.5	Détermination de la CMI :.....	9
2.6	Détermination de la CMB :.....	11
	Résultats et discussions.....	12
1.	Résultats :.....	12
2.	Discussions : .....	18
	Conclusion : .....	20

## **Introduction :**

Les déchets constituent un vrai problème mondial à cause des effets néfastes qu'ils peuvent engendrer sur les écosystèmes, la santé humaine et l'économie d'un pays.

En effet, les déchets représentent l'un des dangers les plus graves pour l'environnement surtout par la pollution de l'eau, du sol et de l'air (Diabaté, 2010), ce qui impose leur bonne gestion. Cette dernière nécessite une coopération et une coordination continue entre toutes les parties prenantes ; les politiques, les économistes et les scientifiques afin de pouvoir lutter contre la pollution de l'environnement et de préserver les écosystèmes, la santé humaine, l'économie des matières premières et l'énergie (Anonyme, 2016).

Dans ce contexte, s'inscrit le présent travail, dont le but principal est de contribuer à la valorisation des produits secondaires des traitements des déchets végétaux nommés : GD, AA, AB (extraits), BB et AP (huiles) résultant de la transformation des déchets végétaux par l'évaluation de leurs activités antimicrobiennes, en charbon actifs, ces produits qui en grande quantités, peuvent provoquer la pollution du sol, de l'air et de l'eau.

# **Etude bibliographique :**

## **1. Déchets :**

### **1.1 Définitions des déchets :**

Un déchet est une matière première ou secondaire qui désigne un produit issu du recyclage des déchets et pouvant être utilisés en substitution totale ou partielle de matière première vierge (BOUTERFAS, 2017).

### **1.2 Concept de déchets :**

#### **a. Ancien concept :**

Le déchet à une « NON VALEUR », une nuisance, une pollution et un danger dont il fallait s'en débarrasser.

#### **b. Nouveau concept :**

Actuellement, le déchet est considéré comme une « RESSOURCE », une matière première à gérer (BOUTERFAS, 2017).

## **2. Typologie des déchets :**

La classification des déchets peut être déterminée en se basant sur l'origine du déchet, sa dangerosité, ou, en fonction du traitement appliqué (BOUTERFAS, 2017).

#### **a. Classification selon l'origine des déchets :**

La classification selon l'origine du déchet, permet de distinguer les déchets municipaux, les déchets de chantiers et les déchets d'activités économiques.

#### **b. Classification selon la dangerosité des déchets :**

La classification selon les propriétés de dangers des déchets, permet de distinguer les déchets dangereux, les déchets non dangereux non inertes et les déchets inertes (Anonyme, 2014).

#### **c. Sources et natures des déchets :**

Les déchets proviennent de plusieurs secteurs. Les différentes sources identifiées sont présentées dans le tableau ci-dessous :

**Tableau 1 : Source et nature de production des déchets (JULIEN, 2005)**

<b>Sources</b>	<b>Nature</b>
Ménages	Déchets biodégradable (forte proportion), plastique, verre, textile, papier, carton

Marchés	Semblable à ceux des ménages mais en plus faible quantité
Magasins/boutiques	Les matières plastiques, les papiers et cartons sont en forte proportion
Restaurants	Déchets biodégradables (forte proportion), plastiques, carton etc.
Ecoles	Les papiers, les cartons et les matières plastiques sont en forte proportion
Bureaux administratifs	Les papiers, cartons sont en forte proportion
La pêche	Les déchets biodégradables rencontrés sur les côtes sont en forte proportion.
Hôtels	Les déchets biodégradables sont en forte proportion

### **3. Impacts des déchets :**

#### **3.1 Impact sur l'environnement :**

La décomposition des déchets (les éléments organiques) sous l'action de l'eau, l'air et de la température peuvent provoquer des dangers immédiats ou lointains considérables sur l'environnement et sur l'Homme. Ce phénomène est plus grave lorsque les déchets sont mal gérés. En effet, les déchets sont composés de matériaux fermentescibles, de matériaux recyclables, de matériaux dangereux, inertes et/ou de matériaux plastiques.

Les déchets constituent l'un des dangers les plus importants pour l'environnement notamment par la pollution de l'eau, sol et de l'air (Diabaté, 2010).

#### **3.2 Impact sur la santé :**

Un des effets négatifs et néfastes de l'absence de la gestion des déchets rationnelle, l'apparition de diverses maladies à cause des déchets qui provoquent d'une manière directe ou indirecte. Lorsque

l'accumulation de déchets conduit à l'émission de mauvaises odeurs et la prolifération des mouches, des insectes et des rats entraînant des dommages de santé à travers les insectes (TAHRAOUI, 2006).

### **3.3 La gestion des déchets :**

La collecte, le tri, le recyclage et la valorisation des déchets permettent l'atténuation du réchauffement climatique, la protection de l'environnement et des écosystèmes, la préservation de la santé ou encore l'économie des matières premières ou de l'énergie (Anonyme, 2016).

## **4. Bactéries :**

### **4.1 *Escherichia coli* :**

*Escherichia coli* (*E. coli*), également appelée colibacille, est une bactérie intestinale à Gram négatif, en forme de bâtonnet, sa taille est de 0,5 à 3µm, mobile. Les Colonies sont arrondies, lisses à bord régulier de 2 à 3 mm de diamètre. En effet, *E. coli* compose environ 80 % de notre flore intestinale aérobie. Découverte en 1885 par Theodor Escherich, dans des selles de chèvres, c'est un coliforme fécal généralement commensal. Cependant certaines souches d'*E. coli* sont pathogènes, comme *E. coli* Entéro-Pathogènes, et *E. coli* Entéro-Hémorragiques entraînant des gastro-entérites, des hémorragies intestinales, des infections urinaires ou de sepsis (Roughyatou KA,2014).

### **4.2 *Staphylococcus aureus* :**

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), appartenant au genre des *Staphylococcus*, le staphylocoque doré est une bactérie Gram positif immobile qui se présente comme une coque (cocci) d'environ 1µm de diamètre, seul, en deux ou associée en amas (grappe de raisin). Les colonies sont d'environ 1mm de diamètre, ronde, bombés, lisses et brillante.

### **4.3 Antibactérien :**

Antibactérien est toute substance d'origine naturelle, semi-synthétique ou synthétique qui provoque la mort des bactéries ou inhibe leur croissance.

Le spectre d'action des médicaments antibactériens peut être sélectif et large. Dans le premier cas, les antibiotiques peuvent affecter principalement la flore cocci, gram-négative ou gram-positive, anaérobie, l'agent causal de la tuberculose. Les antibiotiques à large spectre peuvent tuer ou inhiber la croissance de la plupart des bactéries. Les médicaments antibactériens n'affectent pas les virus, les protozoaires et les champignons.

### **4.4 Comment un antibiotique peut-il agir sur les bactéries :**

Selon les principes actifs, le site intime de cette action peut être une membrane bactérienne, certains ribosomes ce qui conduit à l'inhibition de nombreuses synthèses, ou des enzymes. Le mécanisme d'action déterminera le « spectre d'action » de cet antibiotique, c'est à dire les types de germes sur lesquels cet antibiotique est susceptible d'agir.

Les méthodes utilisées pour évaluer l'activité antimicrobienne *in vitro* des huiles essentielles sont nombreuses et donnent parfois des résultats différents selon les conditions expérimentales adoptées par chaque manipulateur (DJENADI, 2011).

#### **4.5 Méthodes utilisées dans les études des effets antibactériens :**

Les méthodes d'évaluation les plus utilisées sont la méthode de diffusion sur l'Agar et la méthode de dilution. Dans la première méthode, les échantillons sont déposés sur des disques de papier ou dans des puits creusés dans l'Agar. Dans la seconde méthode, les échantillons sont incorporés dans le bouillon de culture ou d'autres liquides dans lesquels les bactéries sont présentes. Ces différentes techniques sont répertoriées et décrites dans différentes publications (DJENADI, 2011).

##### **a. Méthode du puits ou cylindre :**

Cette méthode est proposée par **Cooper et Woodman en 1946**, reprise par **Shroder et Messing (1949)**, elle mesure une diffusion radiale de l'échantillon à partir d'un puits en donnant une zone d'inhibition claire et facilement mesurable. Elle consiste à découper un tronc circulaire vertical dans la gélose et d'y verser une solution de l'échantillon de concentration connu. L'échantillon diffusant radialement créant une zone d'inhibition circulaire à la surface de la gélose préalablementensemencée avec la suspension bactérienne ou fongique (Boubrit et Boussad, 2007).

##### **b. Méthode de diffusion ou des disques en milieu solide :**

Elle consiste à ensemencer la surface d'un milieu solide par inondation de la souche à tester. Puis à déposer des disques de papier buvard comprenant un antibactérien à une certaine concentration. La boîte ainsi préparée est incubée pendant à 37°C pendant 24 heures. Par la suite les zones d'inhibition de la croissance bactérienne sont mesurées.

Plus la zone d'inhibition est grande, plus la sensibilité de la souche bactérienne testée vis-à-vis de l'antibactérien étudié est grande.

#### **4.6 Définition de la CMI :**

La concentration minimale d'inhibition (CMI) de la croissance bactérienne est la concentration minimale d'un antibactérien inhibant totalement la croissance bactérienne. En effet, l'observation de la gamme de concentration décroissante en échantillon permet d'accéder à la CMI, qui correspond à la plus faible concentration capable d'inhiber la croissance bactérienne (KONAN et al, 2014).

#### **4.7 Définition de la CMB :**

La Concentration Minimale Bactéricide (CMB) correspond à la plus faible concentration en échantillon capable de tuer plus de 99,9% de l'inoculum bactérien initial. Elle définit l'effet bactéricide d'un échantillon.

D'après TOTY et al (2013) La CMB est déterminée en prélevant 3 $\mu$ l à partir des puits négatifs et en le déposant sur le milieu MH solide, puis en les incubant à 37°C pendant 24 heures.

Après l'incubation, la CMB a été considérée comme étant la plus faible concentration en échantillon ayant montré une absence de croissance.

L'effet antibactérien est jugé bactéricide ou bactériostatique en fonction du rapport : CMB/CMI. En effet, si CMB/CMI est inférieure ou égale à 4 donc l'effet est bactéricide. Par contre, si le rapport CMB/CMI est supérieur ou égal à 8 donc l'effet est bactériostatique (TOTY et al, 2013).

# Matériel et méthodes

## 1. Matériel :

### **1.1 Echantillonnage :**

Trois extraits GD, AB, AA et deux huiles BB et AP, extraites de la même source végétale, ont fait l'objet de notre travail.

### **1.2 Microorganismes utilisés :**

Deux souches bactériennes ont été testées :

- ❖ *Staphylococcus aureus* (Gram+)
- ❖ *Escherichia coli* (Gram-)

## 2. Méthodes :

### **2.1 Préparation du milieu :**

Pour préparer un milieu Muller-Hinton (MH), dans une erlenmeyer 38g du produit MH sont solubles dans 1000 ml de l'eau distillée, la fiole est fermée par un coton, mise sur une plaque chauffante et le mélange est porté à ébullition. Ensuite, la fiole est mise dans l'autoclave afin de stériliser le milieu.

Après avoir coulé le milieu dans des boîtes de pétri stériles, ces derniers sont incubés dans l'étuve à 37 °C pendant 24h.

### **2.2 Repiquage des microorganismes :**

Les 2 germes ont été repiqués par la méthode des stries, puis incubés à 37 °C pendant 24h afin d'obtenir des colonies isolées.

### **2.3 Test des huiles :**

#### **a. Préparation de l'inoculum :**

À partir d'une culture pure de 24 heures sur milieu MH, quelques colonies ont été prélevées à l'aide d'une anse stérile. Ensuite, le contenu de l'anse a été transféré dans de l'eau physiologique stérile et la suspension bactérienne a été homogénéisée à l'aide du vortex, l'opacité de cette suspension doit être équivalente à 0,5 Mc Farland ou à une densité optique comprise entre 0,08 et 0,10 lue à une longueur d'onde de 625 nm qui correspond à 10<sup>8</sup> UFC/ml (cette préparation est faite aussi bien pour *E. coli* que pour *Staphylococcus aureus*).

### **b. Préparation des huiles AP et BB :**

Préparation des huiles à 4% :

Dans un tube eppendorf, on solubilise 16 µl de l'huile dans 384 µl du diméthylsulfoxyde (DMSO) puis on mélange le tout par un vortex.

### **c. Préparation des disques :**

Des disques de 5 mm de diamètre en papier Whatman ont été préparés et autoclavés pendant 20 minutes à 120°C.

### **d. Application du test :**

A partir de la suspension bactérienne (*E. coli*) déjà préparée, un volume est versé dans une boîte de pétrie stérile contenant du milieu MH, afin de réaliser l'ensemencement par inondation. Après séchage, l'élimination de l'excès se fait par aspiration. Ensuite, 2 disques de papier Whatman de 6 mm de diamètre ont été déposés à la surface de la gélose puis par une micropipette 10µl de l'huile AP à 4 % sont prélevés et déposés au milieu d'un des 2 disques et sur l'autre disque, 10µl de l'huile BB à 4% sont déposés. (Le même protocole est réalisé pour *staphylococcus aureus*).

Ainsi, une boîte témoin est préparée (le même protocole que précédemment), sur l'un des 2 disques sont déposés 10µl du témoin positif qui est le kanamycine (antibiotique) et sur l'autre, sont déposés 10µl du témoin négatif qui est le DMSO (pour les 2 souches). Ensuite, les boîtes de Pétri ont été incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures. Après l'incubation, le diamètre d'inhibition a été mesuré en millimètres, disque inclus. Chaque test a été réalisé en deux fois.

## **2.4 Test des produits secondaires des traitements des déchets végétaux :**

### **a. Préparation des produits secondaires des traitements des déchets végétaux :**

Dans un tube eppendorf, sont solubilisés 50 mg de l'produits secondaires des traitements des déchets végétaux AB dans 2% du DMSO (2µl de DMSO dans 98 µl de l'eau distillée stérile), puis vortexés jusqu'à ce que les produits soient solubilisés. (Le produit AA est préparé de la même façon que le produit AB).

A partir de la suspension bactérienne (*E. coli*) déjà préparée, un volume est versé dans une boîte de pétrie stérile contenant du milieu MH afin de réaliser l'ensemencement par inondation, puis sécher et l'élimination de l'excès se fait par aspiration. Ensuite, trois puits sont créés par un entonnoir stérile et la gélose est éliminée des puits par une pince d'où la formation de puits. Le premier puit est rempli par le produit AB en utilisant une micropipette, le deuxième est rempli par le produit AA et le troisième est rempli par le témoin négatif qui est le DMSO.

En revanche, le produit GD est soluble dans le tween (20%). 50 mg du GD sont solubilisés dans le tween (20%).

Après avoir réalisé le même protocole, on aura 3 puits, le premier va contenir le produit GD, le deuxième va contenir le tween (témoin négatif) et le troisième va contenir la kanamycine (témoin positif). Chacun des tests est réalisé pour les 2 souches et est réalisé en deux répétitions. Ensuite, les boîtes de Pétri ont été incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures. Après l'incubation, le diamètre d'inhibition a été mesuré en millimètres.

## 2.5 Détermination de la CMI :

La CMI a été déterminée par la méthode de microplaque à 96 puits en utilisant une gamme de concentrations allant de 8 à 0,25 mg/ml pour le produit GD et de 4 à 0,125% pour les deux huiles BB et AP.

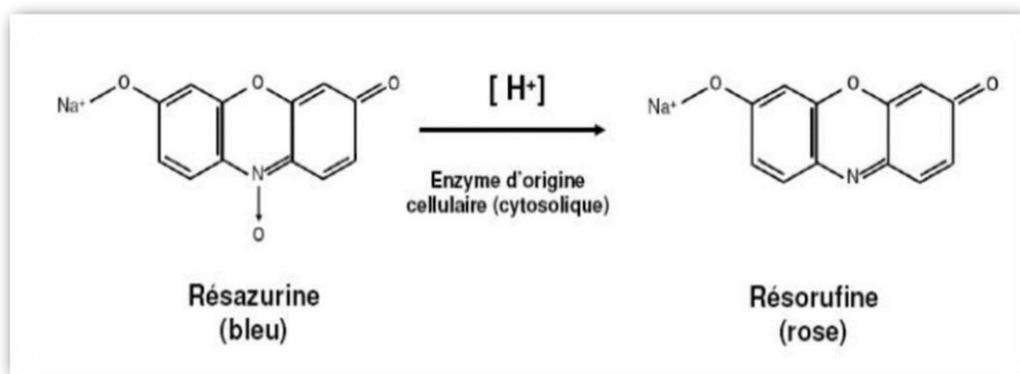
**Tableau 2 : Détermination de la CMI**

8 mg/ml de l'extrait GD( <i>E. coli</i> )	8 mg/ml de l'extrait GD( <i>aureus</i> )	4% de l'huile BB( <i>E. coli</i> )	4% de l'huile BB( <i>aureus</i> )	4% de l'huile AP( <i>aureus</i> )	4% de l'huile AP( <i>E. coli</i> )
4 mg/ml de l'extrait GD( <i>E. coli</i> )	4 mg/ml de l'extrait GD( <i>aureus</i> )	2% de l'huile BB( <i>E. coli</i> )	2% de l'huile BB( <i>aureus</i> )	2% de l'huile AP ( <i>aureus</i> )	2% de l'huile AP ( <i>E. coli</i> )
2 mg/ml de l'extrait GD( <i>E. coli</i> )	2 mg/ml de l'extrait GD( <i>aureus</i> )	1% de l'huile BB( <i>E. coli</i> )	1% de l'huile BB( <i>aureus</i> )	1% de l'huile AP ( <i>aureus</i> )	1% de l'huile AP ( <i>E. coli</i> )
1 mg/ml de l'extrait GD	1 mg/ml de l'extrait GD( <i>aureus</i> )	0,5 % de l'huile BB( <i>E. coli</i> )	0,5% de l'huile BB( <i>aureus</i> )	0,5% de l'huile AP ( <i>aureus</i> )	0,5% de l'huile AP( <i>E. coli</i> )

GD( <i>E. coli</i> )						
0,5 mg/ml de l'extrait GD( <i>E. coli</i> )	0,5 mg/ml de l'extrait GD( <i>aureus</i> )	0,25% de l'huile BB( <i>E. coli</i> )	0,25% de l'huile BB( <i>aureus</i> )	0,25% de l'huile AP ( <i>aureus</i> )	0,25% de l'huile AP ( <i>E. coli</i> )	
0,25 mg/ml de l'extrait GD ( <i>E. coli</i> )	0,25 mg/ml de l'extrait GD( <i>aureus</i> )	0,125% de l'huile BB( <i>E. coli</i> )	0,125% de l'huile BB( <i>aureus</i> )	0,125% de l'huile AP ( <i>aureus</i> )	0,125% de l'huile AP ( <i>E. coli</i> )	
T+ (50 µL LB + 50µL bactérie)	T+ (50 µL LB + 50µL bactérie)	T+ (50 µL LB + 50µL bactérie)	T+ (50 µL LB + 50µL bactérie)	T+ (50 µL LB + 50µL bactérie)	T+ (50 µL LB + 50µL bactérie)	
T <sup>-</sup> (50µl Tween + 50 µl LB)	T <sup>-</sup> (50µl Tween + 50 µl LB)	T <sup>-</sup> (50µl DMSO + 50 µl LB)	T <sup>-</sup> (50µl DMSO + 50 µl LB)	T <sup>-</sup> (50µl DMSO + 50 µl LB)	T <sup>-</sup> (50µl DMSO + 50 µl LB)	

Chaque test a été réalisé deux fois (colonnes vides).

La microplaque a été incubée à 37 °C pendant 24 heures. Ensuite, 15µl de la résazurine ont été ajoutés pour révéler la croissance.



**Figure 3 : Réduction de la résazurine en résorufine catalysée par des enzymes d'origine bactérienne**

Après une incubation à 37°C pendant 30 minutes, les CMI ont été déterminées comme les plus faibles concentrations en produits secondaires ayant montré un changement de coloration de la résazurine. Ainsi, la croissance bactérienne est détectée par la réduction de la résazurine ayant une coloration bleue en résorufine ayant une coloration rose.

## **2.6 Détermination de la CMB :**

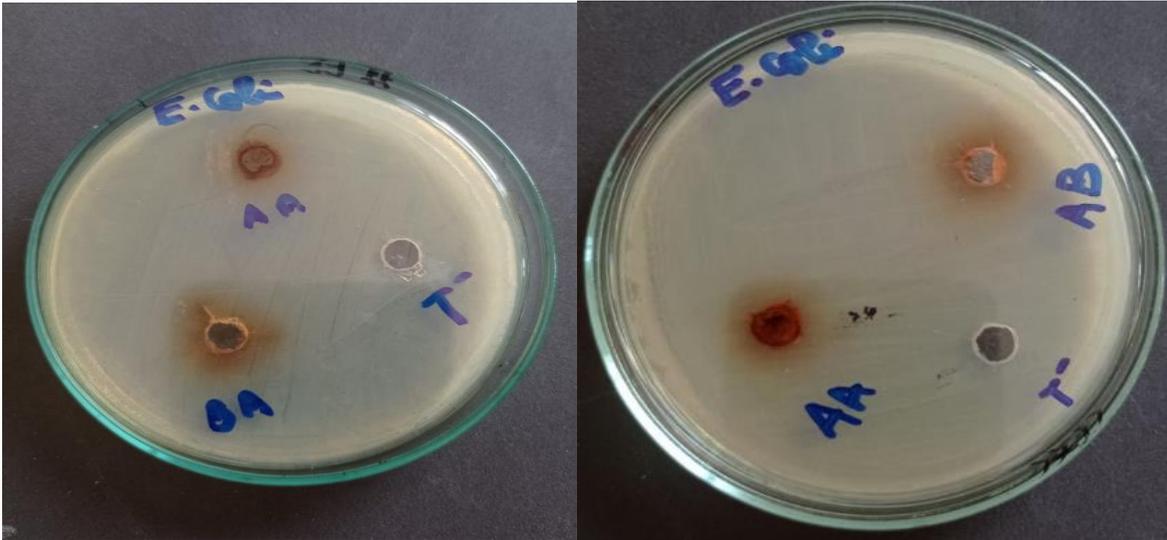
La CMB a été déterminée en prélevant 3µl à partir des puits négatifs et en les déposant sur le milieu Luria-Bertani (LB) solide, puis en les incubant à 37°C pendant 24 heures.

Après l'incubation, la CMB a été considérée comme étant la plus faible concentration en produits secondaires des traitements des déchets végétaux ayant montré une absence de croissance.

## Résultats et discussions

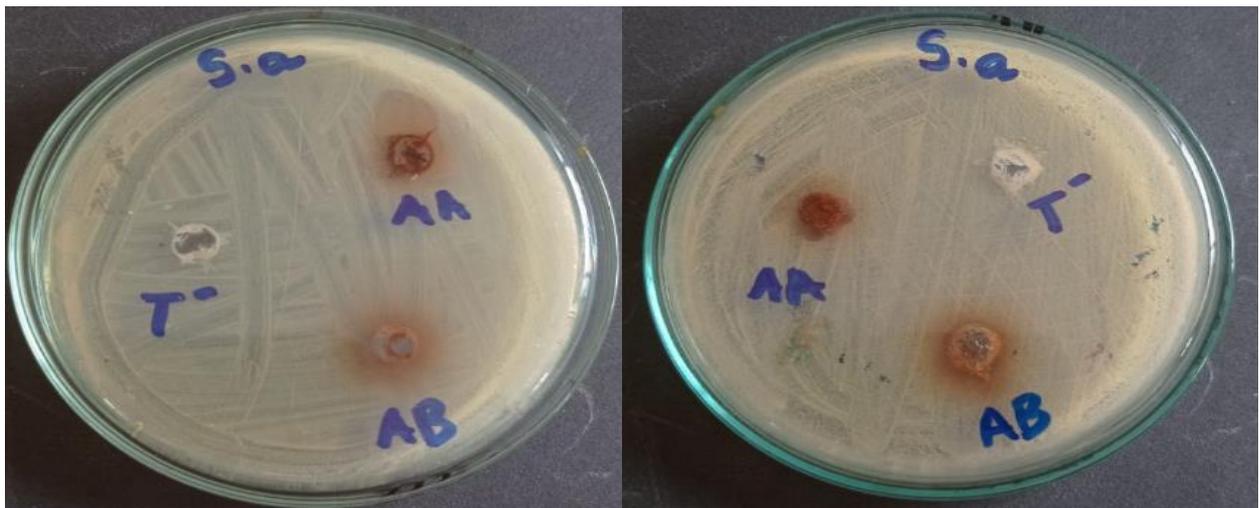
### 1. Résultats :

Le **pouvoir antimicrobien** a été évalué en mesurant les diamètres d'inhibition pour les bactéries (*E. coli* et *Staphylococcus aureus*), et en déterminant la concentration minimale inhibitrice et bactéricide.



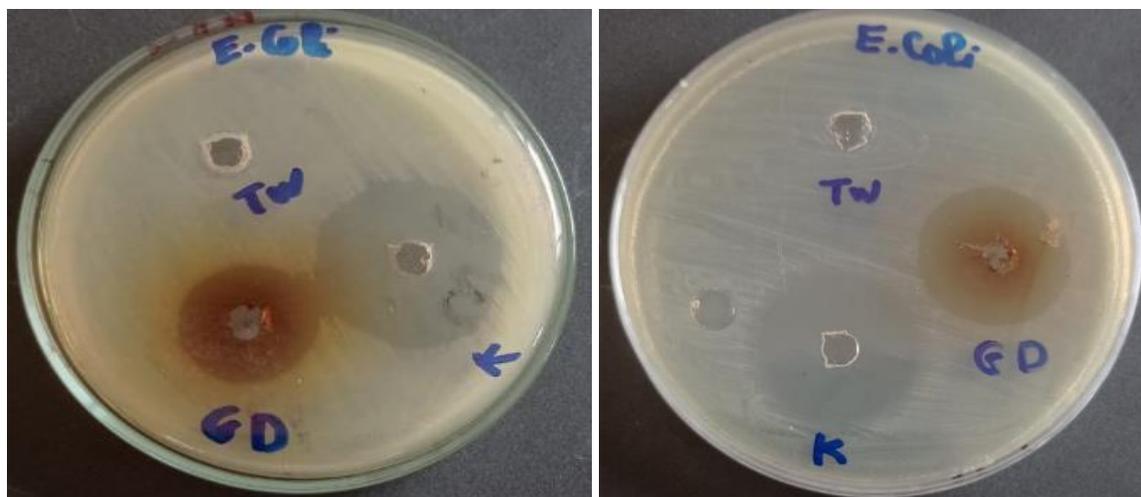
**Figure 4 : Effet des produits AA et AB sur *E. coli***

D'après la **figure 4**, les produits AA et AB n'ont donné aucun effet sur *E. coli*, aucune inhibition puisque le diamètre du disque n'est pas significativement différent de celui du témoin négatif (T) qui est le DMSO.



**Figure 5 : Effet des produits AA et AB sur *Staphylococcus aureus***

D'après la **figure 5**, les produits AA et AB n'ont donné aucun effet sur *Staphylococcus aureus*, aucune inhibition puisque le diamètre du disque n'est pas significativement différent de celui du témoin négatif (T<sup>-</sup>) qui est le DMSO. Par conséquent, ces produits secondaires n'ont aucun pouvoir antimicrobien sur *Staphylococcus aureus*.



**Figure 6 : Effet du produit GD sur *E. coli***

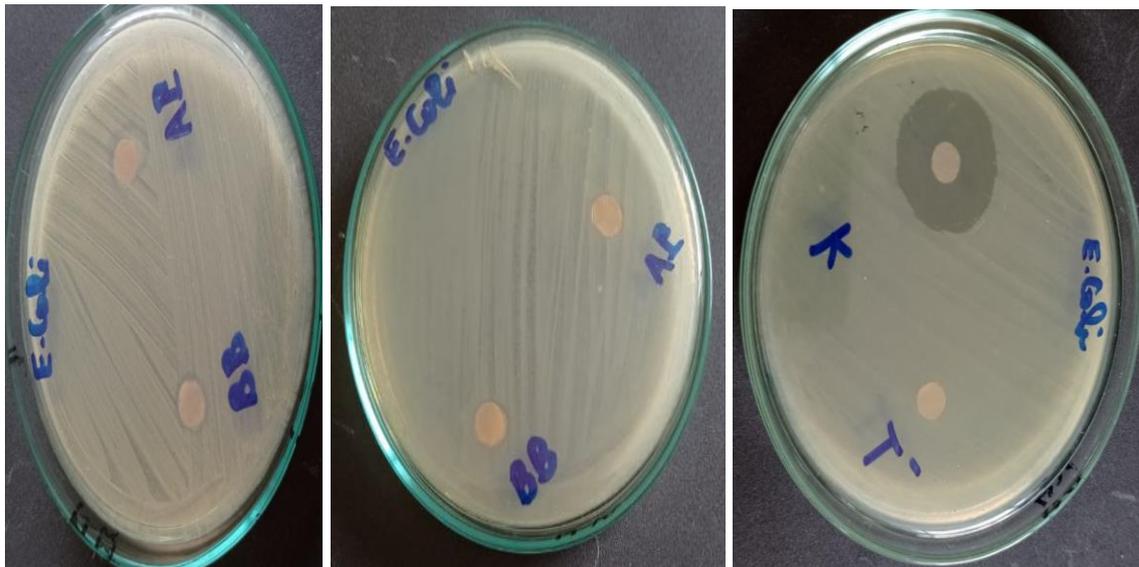
D'après la **figure 6**, le produit GD a montré une zone d'inhibition d'un diamètre important (26,3 mm) presque comparable à celui du Kanamycine « K » (témoin positif) (37,2 mm). Par contre, le tween (Tw) (témoin négatif) n'a pas d'effet sur *E. coli*. Donc, ce résultat est propre au produit secondaire GD. En conséquence, *E. coli* présente une sensibilité à ce produit.



**Figure 7 : Effet du produit GD sur *Staphylococcus aureus***

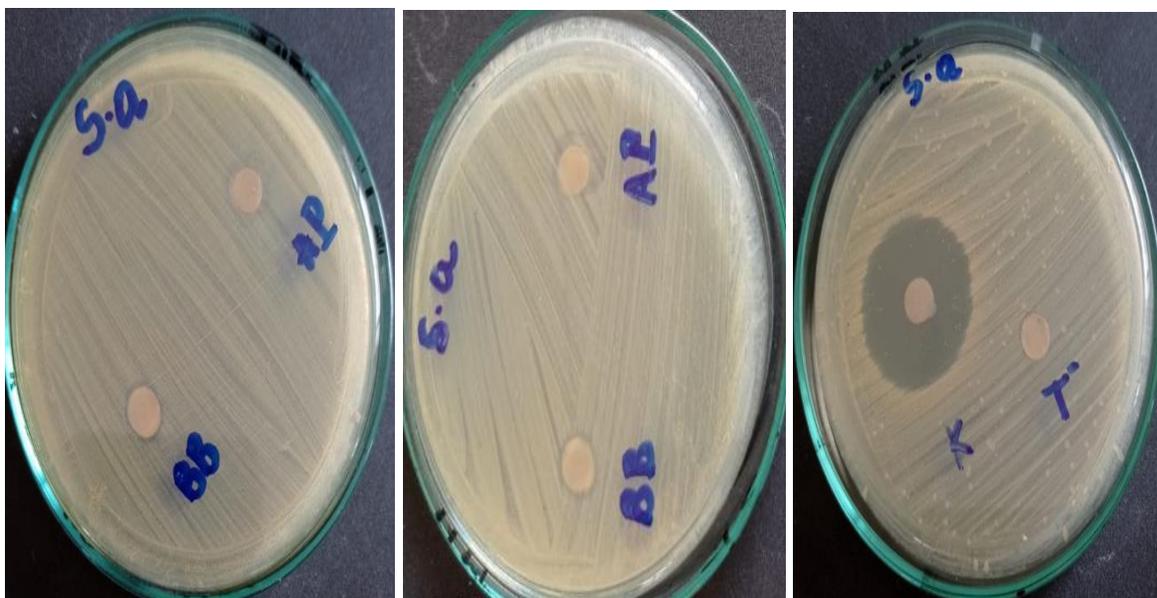
D'après la **figure 7**, le produit GD a montré une zone d'inhibition d'un diamètre important (28 mm) en le comparant avec celui du Kanamycine « K » (30,5 mm). Par contre, le Tween n'a pas d'effet

sur *Staphylococcus aureus*. Donc, ce résultat est propre au produit GD. Ainsi *Staphylococcus aureus* présente une sensibilité à ce produit.



**Figure 8 : Effet des huiles AP et BB sur *E. coli***

Selon la **figure 8**, les huiles BB et AP n'ont montré qu'une petite zone d'inhibition (6 mm) en la comparant avec celle du kanamycine (21 mm). Aussi, le « DMSO » n'a pas montré d'effet sur *E. coli*. Ainsi, les huiles utilisées ont une activité antibactérienne non significative sur *E. coli*.



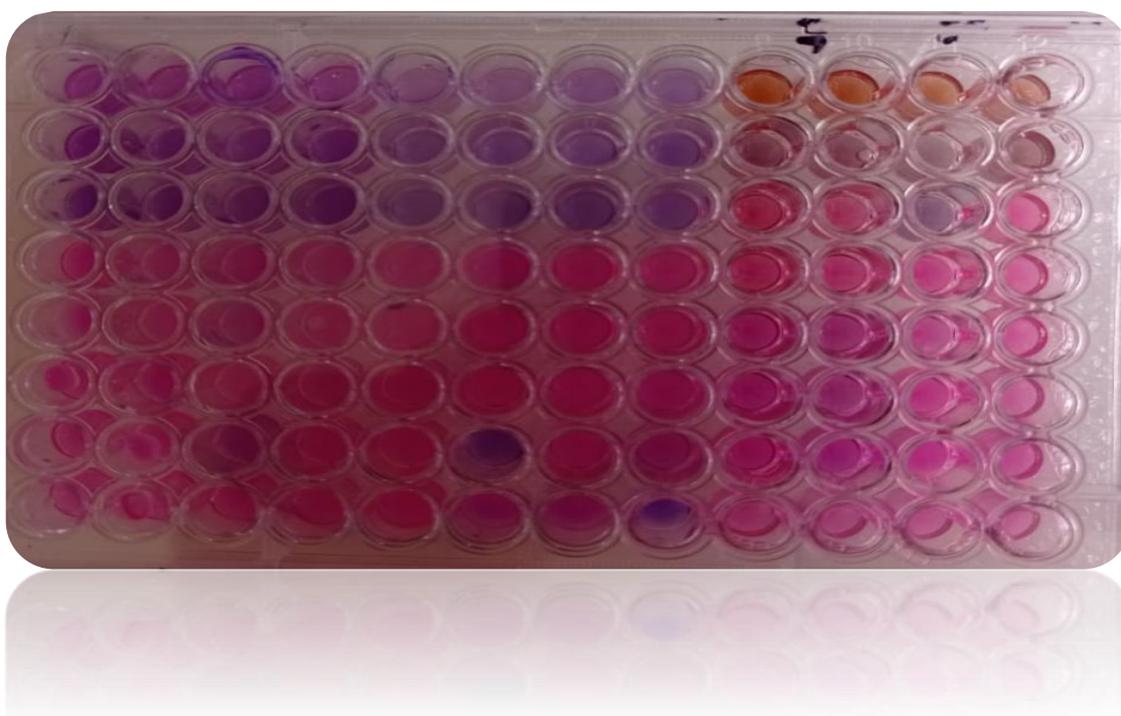
**Figure 9 : Effet des huiles AP et BB sur *Staphylococcus aureus***

D'après la **figure 9**, les huiles BB et AP ont présenté une petite zone d'inhibition (6 mm) par rapport à celle du kanamycine (28 mm). Ainsi, les huiles testées n'ont pas d'activité antibactérienne sur *Staphylococcus aureus*. Le « DMSO » n'a pas d'effet sur *Staphylococcus aureus*.

**Tableau 3 : Diamètre d'inhibition de *E. coli* et de *staphylococcus aureus***

Les souches	Diamètre d'inhibition (mm)				
	AP	BB	GD	AB	AA
<i>E. coli</i>	6	6	23	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	6	6	28	0	0

Une microplaque a été préparée afin de déterminer la concentration minimale inhibitrice.



**Figure 10 : Etude d'une microplaque révélant la CMI**

Dans les deux premières colonnes (à gauche), l'effet de l'huile végétale AP a été testé sur *E. coli*. En effet, le test et sa répétition ont donné le même résultat.

La concentration minimale inhibitrice a été déterminé à partir du 3ème puit, donc la CMI correspond à 1% de la concentration de l'huile AP alors que dans le reste des puits aucune inhibition n'a été révélé (coloration rose).

Dans les puits 3 et 4, l'effet du produit AP a été expérimenté sur *Staphylococcus aureus*. Le test et sa répétition ont montré le même résultat.

La concentration minimale inhibitrice a été déterminé à partir du 3ème puit, donc la CMI correspond à 1% de la concentration de l'huile AP alors que dans le reste des puits aucune inhibition n'a été révélée.

Dans les puits 5 et 6, l'activité de l'huile BB a été évaluée sur *E. coli*. En effet, le test et sa répétition ont donné le même résultat.

La concentration minimale inhibitrice a été déterminée à partir du 3ème puit, donc la CMI correspond à 1% de la concentration de l'huile BB alors que dans le reste des puits, aucune inhibition n'a été détectée. Le même résultat du produit BB a été obtenu sur *staphylococcus aureus* (puits 7 et 8).

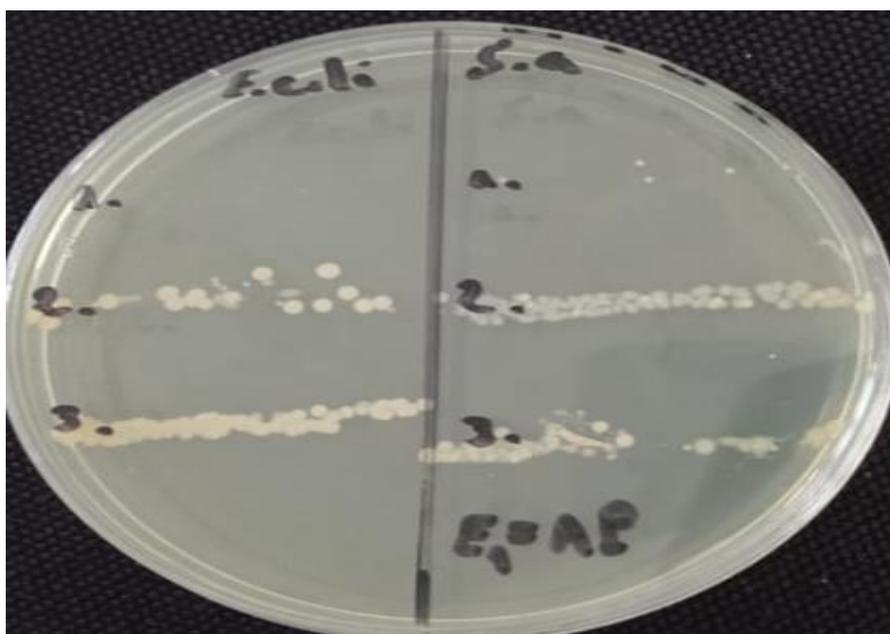
Dans les puits 9 et 10, l'action du produit GD sur *Staphylococcus aureus* a été mise en évidence. En effet, le test et sa répétition ont donné le même résultat.

La concentration minimale inhibitrice a été déterminé à partir du 2ème puit, donc la CMI correspond à 4 mg/ml du produit GD alors que dans le reste des puits aucune inhibition n'a été révélée.

Dans les puits 11 et 12, l'effet du produit GD a été évalué sur *E. coli*. En effet, le test et sa répétition n'ont pas donné le même résultat.

La concentration minimale inhibitrice peut être déterminée à partir du 2ème ou du 3ème puit, donc la CMI correspond à 4mg/ml ou à 2mg/ml.

Les produits AA et AB n'ont pas été testés parce qu'ils n'ont montré aucune zone d'inhibition pour les deux souches.



**Figure 11 : Détermination de la CMB de l'huile AP**

Une boîte de pétri qui contient le milieu nutritif Mueller Hinton « MH » est subdivisée en deux. Une moitié correspond à *E. coli* et l'autre à *Staphylococcus aureus*. Par contre les deux moitiés sont numérotées de 1 à 3. Ces derniers, correspondent aux puits ne présentant pas de croissance bactérienne (La figure 11).

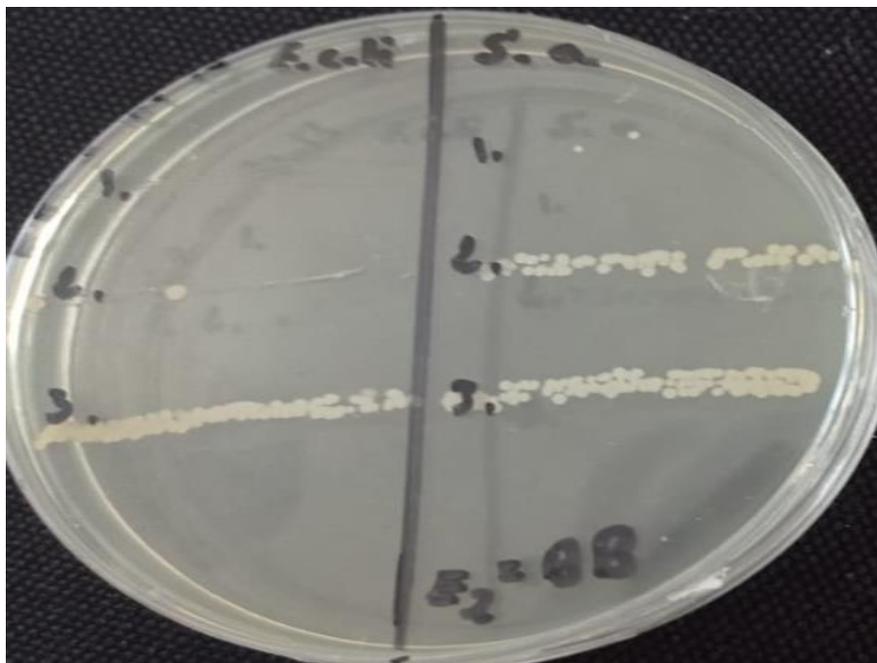
La poussée bactérienne de *S. aureus* notée sur milieu MH montre qu'il y a toujours une croissance de *S. aureus* dans les 3 puits. Donc, impossible de déterminer la concentration minimale bactéricide (CMB) de l'huile AP sur *S. aureus*, la CMB est ainsi indéterminée.

Par contre, l'ensemencement du puit 1 sur milieu MH (à gauche) n'a montré aucune poussée bactérienne donc ce puit ne présente aucune croissance de *E. coli* alors que les puits 2 et 3 ont montré une croissance bactérienne. Donc, la CMB correspond au puit 1 (CMB correspond à 4%).

**Calculons le rapport CMB / CMI :**

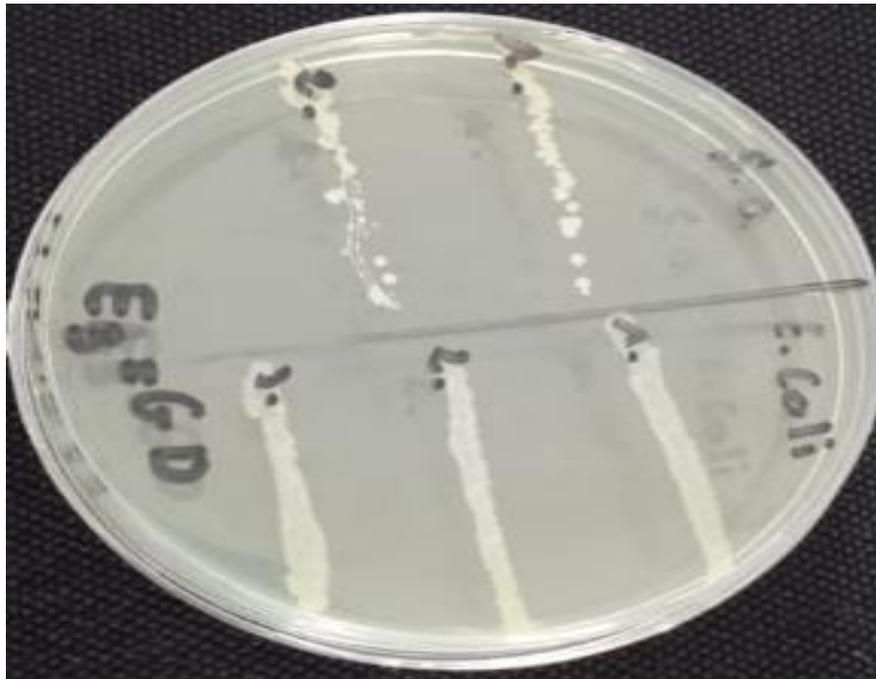
$$\text{CMB} / \text{CMI} = 4/1 = 4$$

Donc l'huile AP a un effet bactéricide sur *E. coli* alors qu'il est bactériostatique sur *Staphylococcus aureus*.



**Figure 12 : Détermination de la CMB de l'huile BB**

La poussée bactérienne de *S. aureus* notée sur milieu MH montre qu'il y a une croissance de *staphylococcus aureus* dans les 3 puits. Donc, la détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) de l'huile BB reste toujours impossible. Le même résultat a été observé pour *E. coli*. Donc la CMB est indéterminée, d'où l'huile BB a un effet bactériostatique aussi bien sur *E. coli* que sur *staphylococcus aureus*.



**Figure 13 : Détermination de la CMB du produit GD**

La poussée bactérienne de *S. aureus* notée sur milieu MH dévoile qu'il y a toujours une croissance de *Staphylococcus aureus* dans les 2 puits. Donc, impossible de déterminer la concentration minimale bactéricide (CMB) du produit secondaire GD.

Le même résultat est noté pour *E. coli*. Par conséquent, la CMB est indéterminée. Alors, le produit GD a un effet bactériostatique sur les 2 souches.

## **2. Discussions :**

D'après les résultats obtenus, les souches bactériennes étudiées sont très sensibles à l'antibiotique testé (kanamycine) (23,8 mm pour *E. coli* et 30,5 mm pour *S. aureus*).

Par contre, en ce qui concerne les produits secondaires des traitements des déchets végétaux expérimentés au cours de cette étude seul le produit GD semble être actif sur *Escherichia coli* (bacille Gram négatif) que sur *Staphylococcus aureus* (Cocci Gram positif) par rapport à la Kanamycine (26,3 mm pour *E. coli* et 28 mm pour *S. aureus*).

Ceci pourrait être lié à l'un ou à plusieurs de ses composants chimiques qui auraient des propriétés antimicrobiennes.

Ce résultat est concordant avec les études de Wendakon et Sakaguchi (1995), qui ont révélé que les bactéries à Gram positif sont plus sensibles aux effets inhibiteurs des produits testés. En effet, les bactéries à Gram négatif sont caractérisées par un phénomène de résistance. Cela est expliqué par la présence d'une membrane externe imperméable aux composés lipophiles. Par contre, les bactéries à Gram positif sont caractérisées par leurs sensibilités ce qui peut être expliqué par l'absence de cette

membrane externe en permettant le contact direct des constituants hydrophobes des produits avec la bicouche phospholipidique de la membrane cellulaire bactérienne qui entraîne une augmentation de la perméabilité aux ions et la fuite des constituants intracellulaires vitaux ou l'altération des systèmes enzymatiques bactériens.

Pour les produits AA et AB les souches étudiées ont montré une résistance. Ces produits pourraient ne pas renfermer de molécules bioactives.

Aussi, l'activité antibactérienne testée par les huiles végétales contre *E. coli* et *S. aureus* a montré que ces derniers ont présenté une résistance contre les huiles AP et BB. Par conséquent, ces huiles ne posséderaient pas ou contiendraient de faibles quantités en molécules actives.

Le rapport CMB/CMI permet de définir le caractère bactériostatique ou bactéricide d'une huile. Lorsque ce rapport est inférieur à 4 (Éberlin T,1994), l'huile est considérée comme bactéricide

Pour cette étude, seul le rapport CMB/CMI calculé pour la souche *E. coli*, avec l'huile AP était égal à quatre. Il ressort donc que l'huile AP a un pouvoir bactéricide sur *E. coli*.

## **Conclusion :**

Notre étude a visé à découvrir les activités antimicrobiennes des produits BB, AP, GD, AA et AB sur les souches d'*E. coli* et de *S. aureus* dans le but de valoriser ces déchets pour contribuer positivement à la protection de l'environnement et à la diminution de la quantité de déchets évacués en augmentant leur durée d'exploitation.

Les résultats obtenus lors GD a montré une zone d'inhibition plus importante sur *S. aureus* (Gram+) que sur *E. coli* (Gram-). Ce produit possède un effet bactériostatique sur les deux souches qui est mis en évidence par la détermination de la concentration minimale inhibitrice (2 mg/ml).

Les produits BB et AP ont révélé une faible activité antimicrobienne contre *E. coli* et *S. aureus* en utilisant la méthode de diffusion sur gélose. Cependant, l'étude de leur CMI montre qu'ils ont un effet bactériostatique sur les deux souches testées. Le rapport CMB/CMI affirme l'effet bactéricide du produit AP sur *E. coli*.

Par contre les produits AA et AB n'ont montré aucune activité antibactérienne.

En perspective d'utiliser des méthodes modernes pour l'extraction des principes actifs et de valoriser leur présence par des techniques précises, d'étendre le choix des germes à tester à d'autres souches multirésistantes, d'étudier leurs effets pharmacologiques tel que l'effet antioxydant et d'augmenter les concentrations initiales des produits testés dans le but d'avoir une activité antibactérienne.

# **BIBLIOGRAPHIE**

- [1] Roughyatou KA (2014), Recherche d'Escherichia coli O157 dans les selles et les produits carnés. RAMReS Sciences de la Santé ISSN 2630-1113. Vol. 2, No 2.
- [2] Éberlin T (1994), Les antibiotiques Classification, mode d'action et utilisation thérapeutique. Nathan, Paris, 88 p
- [3] Boubrit S. et Boussad N., (2007), Détermination "in vitro " du pouvoir antibactérien des huiles essentielles d'eucalyptus, myrte, clous de girofle et sarriette, et leur application à la conservation de la viande fraîche type hachée, Université Mouloud Mammeri de Tizi-ouzou, Ingénieur d'état en biologie, option contrôle de la qualité et analyses.
- [4] KONAN FK., Guessenn N., Oussou KR. et Bahi C. (2014), Effet antibactérien des produits secondaires des traitements des déchets végétaux aqueux de l'écorce de Terminalia glaucescens Planch ex Benth (Combretaceae) sur la croissance in vitro des entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi (EBLSE), / Int. J. Biol. Chem. Sci. 8(3) : 1192-1201.
- [5] TOTY A A., GUESSENND N., BAHY C., KRA A. M., OTOKORE D. A., DOSSO M., (2013), Évaluation in-vitro de l'activité antibactérienne des produits secondaires des traitements des déchets végétaux aqueux de l'écorce de tronc de Harungana madagascariensis sur la croissance de souches multi-résistantes, Revue « *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège* », V 82, p. 12 – 21.
- [6] Diabaté M., (2010), déchets ménagers : impact sur la santé et l'environnement.
- [7] ANONYME, (2013), Analyse du niveau de connaissance de la population de la ville de BUKAVU sur la gestion des déchets ménagers : cas de la commune d'IBANDA, SUD- KIVU.
- [8] BOUTERFAS I., (2017), Identification et Caractérisation des déchets ménagers solides de la ville de Tlemcen, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'univers, mémoire de master en écologie.
- [9] JULIEN R., (2005), « Typologie et analyse de la gestion des déchets municipaux ordures ménagères et déchets de marché ».
- [10] TAHRAOUI N., (2006), Analyse des déchets ménagers solides de la ville de Chlef.

# **WEBOGRAPHIE**

[11] <http://www.chups.jussieu.fr/polys/pharmaco/poly/antibacteriens.html>