



## Projet de Fin d'Etudes

Licence Sciences & Techniques

Biotechnologie et Valorisation des Phyto-ressources

Evaluation de l'activité antibactérienne de certaines huiles essentielles sur *Allorhizobium vitis*, *Agrobacterium tumefaciens* et *Erwinia amylovora* "In vitro"

**Présenté par** : Nassima EL FARROUD

**Encadré par** :

- Dr. EL ACHBANI Hassan (INRA-Meknès)
- Pr. BOUCHAMMA El-Ouazna (FST-Fès)

**Soutenu le** : 07/07/2021

Devant les jurys composé de :

- Pr .El GHACHTOULI Naima
- Pr. BOUCHAMMA El-Ouazna
- Dr. EL ACHBANI Hassan

**Année universitaire : 2020-2021**

## SOMMAIRE

- Dédicace
- Remerciements
- Présentation de l'INRA de Meknès
- Résumé
- Liste des abréviations
- Liste des tableaux
- Liste des figures
- Introduction (p. 1)

### Partie I : Revue Bibliographique

#### A : Plantes Aromatiques et Médicinales (p.3)

1. Terminologie (p.3)
2. Historique (p.3)
3. Plantes Aromatiques et Médicinales étudiées (p .4)

#### B : Huiles essentielles (p.5)

1. Définition (p.5)
2. Répartition des huiles dans la plante (p.5)
3. Biosynthèse (p.3)
4. Caractères physicochimiques des Huiles Essentielles (p.6)
5. Contrôle et qualité (p.7)
6. Procédés d'extraction (p.7)
7. Composition chimique et variabilité (p .9)
8. Toxicité des huiles essentielles (p.10)

#### C : Activité antibactériennes des huiles essentielles (p.11)

1. les bactéries phytopathogènes étudiées (p.11)
2. Généralités sur le pouvoir antibactérien (p.12)

### Partie II : Matériel et Méthodes

1. Matériel végétale (p.14)
2. Matériel microbiologique (p.14)
3. Extraction des huiles essentielles (p.14)
4. Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles par diffusion en milieu solide (p.15)
  - 4.1 Préparation des cultures microbiennes (p.15)
  - 4.2 Diffusion sur disque (p.15)
5. Concentration minimale inhibitrice CMI (p.16)
6. Concentration minimale bactéricide CMB (p. 17)
7. Analyse statistique (p.18)

### Partie III : Résultats et discussion

1. Screening de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles (p.19)
2. Conception du mélange de surface (p.20)
3. Analyse de variance (p.21)
4. Analyse des surfaces de réponse (p.22)

5. Indice d'efficacité antimicrobien (**p.30**)
6. Effet bactéricide et bactériostatique (**p.31**)

- Conclusion générale et perspective (**p.33**)
- Annexes
- Références bibliographiques

## **Dédicaces**

Je dédie ce travail avec un grand amour, sincérité et fierté,  
A la mémoire de mon père EL FARROUD Hassan que son âme repose en paix auprès de  
Dieu.

### ***A MA TRES CHERE MERE***

Mme BOUDRAA Fatima, qui, grâce à elle que j'ai parcouru des années d'études, elle m'a comblé avec sa tendresse et affection tout au long de mon parcours, elle était, et elle sera toujours ma première source de soutien, malgré tous les échecs elle était toujours présente à mes côtés pour me consoler quand il fallait .Je te dois ma vie. Je t'aime énormément.

### ***A MA CHERE GRAND MERE MATERNELLE***

Que ce modeste travail, soit l'expression des vœux que vous n'avez cessé de formuler dans vos prières. Que Dieu vous préserve santé et longue vie.

### ***A MES DEUX CHERES SOUERS***

Meryem et Imane, mes amies fidèles, qui m'ont assisté dans les moments difficiles et m'ont pris doucement par la main pour traverser ensemble des épreuves pénibles.

### ***A MES CHERS NEVEUX ET NIECES A MES CHERS ONCLES, TANTES***

### ***A MES CHERS COUSIN, COUSINES***

***A TOUS MES CHERS AMIS, A TOUS MES PROFESSEURS ET A TOUT QUI M'ONT  
PERMIS DE REALISER CE MODESTE TRAVAIL.***

## Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens à adresser mes sincères remerciements à tous ceux qui m'ont aidée à la réalisation de ce projet de fin d'études et en particulier,

J'exprime ma gratitude à **Monsieur IJJAALI Mustapha**, le doyen de la Faculté des sciences et techniques de Fès, pour l'aide qu'il porte à la recherche scientifique.

Mes remerciements vont plus particulièrement à **Monsieur AMRANI Khalid**, coordinateur de la filière LST-BVPR à la FSTF, pour ses orientations et l'aide qui nous a apportés tout au long de cette formation.

J'exprime ma profonde considération au Directeur du centre régionale de la recherche agronomique Meknès Docteur et Chercheur **BENTAIBI Abderrahim** pour m'avoir accepté au sein du centre, et m'avoir assuré tous les conditions, afin que je puisse effectuer ce stage dans les meilleures conditions.

Mes remerciements au Docteur **ACHBANI El Hassan**, Chercheur bactériologiste Responsable Scientifique Coordinateur de l'unité de recherche de la protection des plantes Et Chef du laboratoire de Bactériologie. Vous nous avez confié ce travail et aidé à son élaboration. Vos qualités professionnelles et humaines, votre gentillesse et votre lucide compréhension sont pour nous un exemple à suivre. Veuillez trouver ici l'expression de mes sentiments les plus distingués en symbole de ma reconnaissance.

J'adresse mes vifs remerciements à Professeur **BOUCHAMMA El- Ouazna**, enseignante chercheur, professeure à la Faculté des Sciences et Techniques de Fès, pour ses conseils, sa disponibilité et sa gentillesse, qu'elle trouve dans ce modeste travail l'expression de notre profonde gratitude et notre haute considération.

Je remercie chaleureusement **Pr. EL GHACHTOULI Naima** qui a accepté d'examiner et de juger ce travail.

Un merci bien particulier adressé à l'ex-responsable de l'institut national des plantes aromatiques et médicinales **Mr AZZA Smail**, pour sa disponibilité, son aide, son intérêt, ses orientations, ses remarques et ses conseils qui m'a généreusement accordé. Un grand merci.

Un merci A tous les membres de l'équipe du laboratoire de bactériologie du centre régionale de la recherche agronomique Meknès et particulièrement à **SAHLAOUI Tarik**, jeune chercheur, pour son aide et ses explications tous au long la durée du stage vraiment merci.

Je formule mes sincères remerciements à tous mes professeurs et collègues du Licence BVPR.

Merci à toute personne qui m'a aidée de près ou de loin à accomplir ce travail.

# PRESENTATION DE L'ORGANISME D'ACCUEIL

## I. Présentation de l'INRA

Le présent travail est réalisé au niveau du laboratoire de bactériologie de l'unité de Recherche Protection des Plantes (URPP) révélant du Centre Régional de la Recherche Agronomique de Meknès (CRRAM) situé au Qualipole Alimentation de Meknès.

### I.1. Présentation

L'institut National de la Recherche Agronomique « **INRA** » est un établissement public dont les origines remontent à 1914, ayant pour mission d'entreprendre les recherches pour le développement agricole. C'est un institut de recherche producteur de connaissances scientifiques et technologiques au service du bien –public, accompagnant l'innovation économique et sociale dans les domaines de l'alimentation, l'agriculture et de l'environnement.

L'**INRA** opère à travers dix centres régionaux de la recherche agronomique et 23 domaines expérimentaux répartis sur le territoire national et couvrant les divers agrosystèmes du pays

Lui permettant d'être à l'écoute de son environnement. Les projets de recherche de l'**INRA** sont définis avec la participation des partenaires, des clients et des prescripteurs régionaux. Ils sont menés au sein de trente unités de recherche hébergés par les Centres Régionaux. Ils sont encadrés à l'échelle centrale par dix départements scientifiques à vocation disciplinaire. Pour accomplir sa mission et être au diapason de l'actualité scientifique, l'**INRA** entretient des relations de partenariats avec des organisations nationales et internationales, les structures de développement, le secteur privé et les Organisations Non Gouvernementales.

### I.2. Unités de recherche

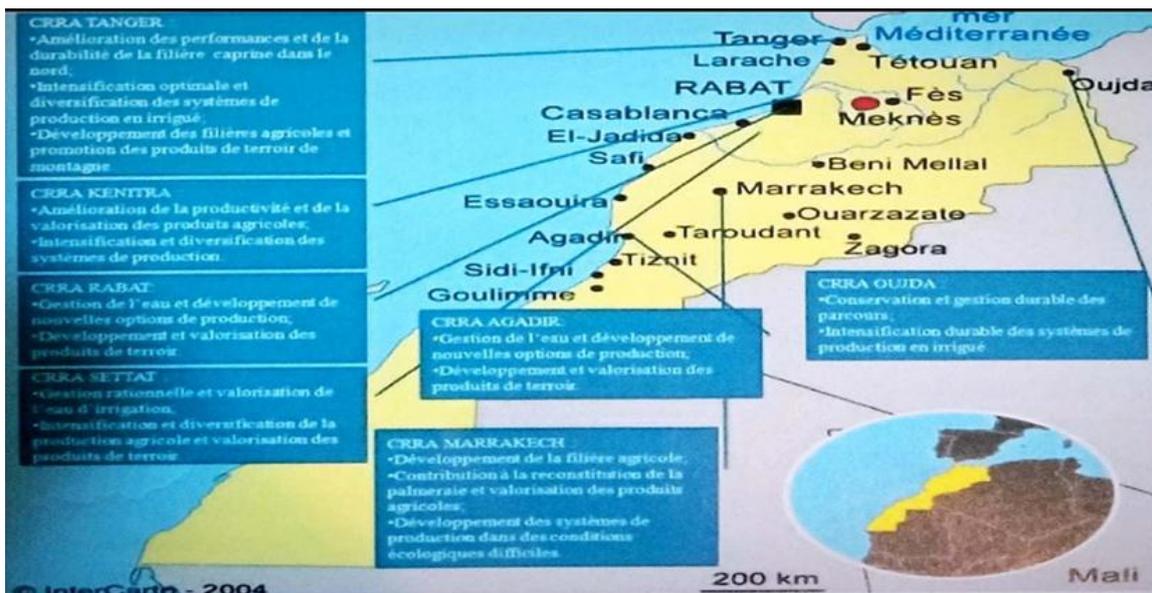
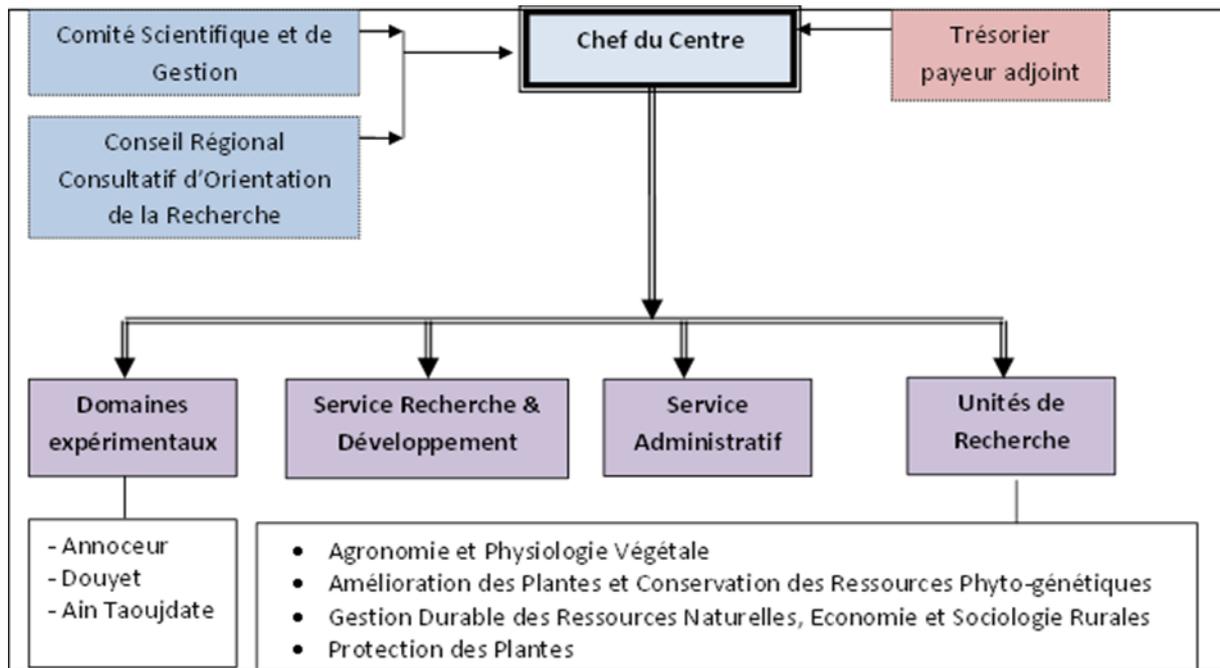


Figure 1 : Quelques centres régionaux de recherche agronomique

### I.3. Organigramme de l'INRA



**Figure 2 :** Organigramme de l'INRA

## II. INRA Meknès

Le CRRRA Meknès est une institution à profond ancrage historique qui développe une stratégie de recherche actualisée pour la production de technologies, connaissances et méthodes. Les recherches du centre accompagnent la mise en œuvre des plans régionaux adoptés dans le cadre du Plan Maroc Vert et étroite collaboration avec le développement et la profession.

C'est une entité régionale opérant dans une zone incluant différents agro systèmes, par des recherches, études et actions de recherche-développement visant :

- Une meilleure connaissance du milieu et développement de technologies adéquates
- Une valorisation des acquis et une implication des partenaires dans la recherche

### II.1. Unités de recherche

- Agronomie et physiologie végétale
- Protection des plantes
- Amélioration des plantes et conservation des Ressources Phylogénétiques
- Gestion durable des Ressources Naturelles

## II.2. Compétences scientifiques et techniques

- 25 Chercheur (se) s spécialisé(e)s dans différentes disciplines des sciences agronomiques et humaines (amélioration génétique, phytiatrie, biotechnologie, agronomie, physiologie végétale, horticulture, agro météorologie, pédologie, chimie des sols, agro économie, sociologie et communication)
- 17 Technicien(ne)s de recherche
- Un administrateur
- 31 Agents

## II.3. Zone d'action agricole

- Le Centre Régional de la Recherche Agronomique de Meknès couvre la zone d'action des Directions Provinciales d'Agriculture (DPA) de Boulemane, El Hajeb, Fès, Ifrane, Khénifra, Meknès, Taounat, Taza et Séfrou.
- Superficie totale : 7300000 ha (9,8 % du territoire national)
- Economie basée sur une agriculture diversifiée valorisée par une importante industrie agroalimentaire



Figure 3 : Zone d'action du CRRA de Meknès



Figure 4 : Siège du CRRA de Meknès

## II.4. Présentations et services de qualité

- Réalisation d'études et de recherches
- Conception et réalisation de projets de développement agricole
- Analyse du sol, eau et plante et diagnostic de l'état sanitaire des cultures
- Animation de sessions de formation, de perfectionnement et de transfert de technologie
- Elaboration de supports de vulgarisation (fiche technique, CD interactif, supports de projections, ...)
- Encadrement de thésards, mémorisant et de stagiaires.

### III. Qualipole de Meknès

Le Qualipole Alimentation de Meknès est un pôle multi-institutionnel initié par le ministère de l'Agriculture et de la Pêche Maritime dans le but de renforcer l'innovation et la compétitivité du secteur de l'agro-industrie.

#### III.1. Structures de l'INRA au Qualipole Meknès



**Figure 6** : Bloc INRA au Qualipole Meknès

Le Centre Régional de la Recherche Agronomique représente l'INRA au sein du Qualipole Alimentation de Meknès à travers les structures opérationnelles suivantes :

##### III.1.1 Quatre laboratoires spécialisés

- Laboratoire Analyses sol-plante-eau
- Laboratoire Protection des plantes
- Laboratoire Technologie Alimentaire
- Laboratoire système d'information géographique

##### III.1.2 Plateforme d'innovation

Essaie de démonstration des créations variétales INRA en matière notamment d'arboriculture fruitière et d'olivier. La plateforme héberge une station météorologique.

##### III.1.3 Des espaces communs

- Une bibliothèque proposant les différentes publications de l'INRA dont les fiches techniques et les ouvrages scientifiques.
- Une salle de réunions.

#### III.2. Laboratoires Protection des plantes

Les travaux de recherche conduits au sein du laboratoire de protection des plantes visent à améliorer la productivité et la qualité des cultures (maraîchages, arboriculture, céréales, légumineuses alimentaires, etc.) via la mise au point de solutions adéquates pour lutter contre les ennemis des cultures. Les principaux axes de recherche poursuivis sont :

- Protection intégrée des blés dans le Sais et Moyen Atlas contre les maladies fongiques et adventices.
- Protection intégrée de l'arboriculture contre les maladies bactériennes (le feu bactérien des rosacées fruitières à pépins, la tuberculose de l'olivier, le crown Gall de la vigne...) et les insectes (carpocapse du pommier et capnode des rosacées à noyau).

L'URPP est en outre dotée d'outils performants de diagnostic rapide des maladies.

### III.2.1 Les principales activités des laboratoires Protection des plantes.

- Analyse et identification des maladies bactériennes, fongiques et détermination des ravageurs.
- Caractérisation biochimique et moléculaire (PCR conventionnelle et en temps réel) des germes phytopathogènes.
- Biodiversité de certains germes bactériens.
- Production en masse de certains germes bénéfiques pour la santé de la plante

### III.2.2 Equipes de recherche

#### Les chercheurs et chercheuses :

- El Hassan Achbani : Chercheur bactériologiste et Coordinateur de l'UR.
- Abdelhamid Ramdani, Chercheur mycologiste.
- Salma El Iraqui El Houssaini, Chercheuse entomologiste.
- Khaoula Habbadi, Chercheuse protection des arbres fruitiers.
- Mariam El-Harsal, Chercheur protection des plantes.

#### Les techniciens de recherche :

- Abdellatif Benbouazza.
- Hafid Ibriz.



## Résumé

Les phytopathologies (feu bactérien, galle du collet) constituent de sérieuses menaces pour les cultures parce qu'elles affectent leur croissance et leur productivité. Les moyens de lutte traditionnels utilisés tel que l'utilisation de pesticides, sont de plus en plus controversés au regard de leur dangerosité pour la santé et l'environnement. Face à la recherche de nouveaux moyens de lutte nous avons évalué l'activité antibactérienne de huit huiles essentielles seules ou en association sur les bactéries responsables des phytopathologies suscitées. Les méthodes utilisées ont été successivement l'aromatogramme inspirée de l'antibiogramme et la détermination de la concentration minimale inhibitrice puis bactéricide des huiles essentielles. Les résultats ont montré que des huiles essentielles telles que la *cannelle*, l'*origan* et le *thym* sont efficaces contre ces phytopathogènes au regard de leur diamètre d'inhibition qui est plus élevé que des antibiotiques réputés être efficaces contre ces bactéries (streptomycine, rifampicine) ; de plus le rapport CMB / CMI a montré qu'elles ont toutes un effet bactéricide. Par contre, d'autres huiles se sont avérées être moins efficaces en raison de leur diamètre d'inhibition inférieur à celui des antibiotiques utilisés et de leur effet bactériostatique ces sont : le *romarin*, le *cumin* et la *menthe pouliot*. Ainsi, les huiles essentielles à fortes teneur en phénols terpénoïdiques (*l'origan*, *le thym*) ainsi que la *cannelle* représentent des alternatives crédibles en tant que biopesticides pour la lutte contre les phytopathogènes, à raison de faire des études supplémentaires relativement à leur cytotoxicité pour les cultures.

**Mots-clés :** Huile essentielle, bactérie, diamètre d'inhibition, concentration minimale inhibitrice, concentration minimale bactéricide, aromatoigramme.

## Liste des abréviations

<b>PAM</b>	: Plante Aromatique et Médicinale
<b>HE</b>	: Huile Essentielle
<b>OMS</b>	: Organisation Mondial de la Santé
<b>S4</b>	: <i>Allorhizobium vitis</i>
<b>C58</b>	: <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<b>E.A</b>	: <i>Erwinia amylovora</i>
<b>IPP</b>	: Isopentenyl Pyrophosphate
<b>INSA</b>	: Institut de Normalisation Scientifique d'Aromatologie
<b>HEBBD</b>	: Huiles Essentielles Botaniquement et Biochimiquement Définie
<b>CO2</b>	: Dioxyde de Carbone
<b>CPG</b>	: Chromatographie en Phase Gazeuse
<b>CCM</b>	: Chromatographie sur Couche Mince
<b>CPG-SM</b>	: Chromatographie en Phase Couplée à la Spectrométrie de Masse
<b>RMN</b>	: Résonance Magnétique Nucléaire
<b>CLHP</b>	: Chromatographie Liquide à Haute Performance
<b>TI</b>	: Tumor Inducting
<b>ADN</b>	: Acide Désoxyribonucléique
<b>CMI</b>	: Concentration Minimale Inhibitrice
<b>CMB</b>	: Concentration Minimale Bactéricide
<b>SARM</b>	: Staphylocoque Dorés Résistant à la Mériciline
<b>ACP</b>	: Analyse en Composantes Principales
<b>ANOVA</b>	: Analyse de Variance
<b>LPGA</b>	: Levure, Peptone, Glucose, Agar
<b>LPG</b>	: Levure, Peptone, Glucose

## Liste des tableaux

<b>Tableaux</b>	<b>Page</b>
<b>Tableau 1</b> : Plantes aromatiques et médicinales étudiées	<b>4</b>
<b>Tableau 2</b> : Activité antibactérienne des huiles essentielles et de leur mélange	<b>21</b>
<b>Tableau 3</b> : Analyse Anova	<b>22</b>
<b>Tableau 5</b> : Concentration minimale inhibitrice CMI et bactéricide CMB et leur rapport CMB/CMI pour <i>Erwinia amylovora</i>	<b>32</b>
<b>Tableau 6</b> : Concentration minimale inhibitrice CMI et bactéricide CMB et leur rapport CMB/CMI pour <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<b>32</b>
<b>Tableau 7</b> : Concentration minimale inhibitrice CMI et bactéricide CMB et leur rapport CMB/CMI pour <i>Allorhizobium vitis</i>	<b>32</b>

## Liste des figures

Figures	Page
<b>Figure 1</b> : Synthèse de différentes classes terpéniques chez les plantes	<b>6</b>
<b>Figure 2</b> : Exemple de structures des huiles essentielles présentant une activité antibactérienne	<b>10</b>
<b>Figure 3</b> : Halo d'inhibition de croissance bactérienne sur gélose.	<b>12</b>
<b>Figure 4</b> : Appareil utilisée pour l'extraction des HEs.	<b>15</b>
<b>Figure 5</b> : Activité antibactérienne des huiles essentielles et de leurs mélanges	<b>20</b>
<b>Figure 6</b> : Conception simplexe – centroïde de mélange de surface	<b>21</b>
<b>Figure 7</b> : Surface de réponse de l'effet antibactérien (diamètre de la zone d'inhibition des 3 huiles essentielles et leur mélange sur <i>E. amylovora</i> )	<b>24</b>
<b>Figure 8</b> : Charte Pareto de l'effet antibactérien des trois huiles essentielles et leur mélange sur <i>E. amylovora</i>	<b>25</b>
<b>Figure 9</b> : Surface de réponse de l'effet antibactérien (diamètre de la zone d'inhibition des 3 huiles essentielles et leur mélange sur <i>Agrobacterium tumefaciens</i> )	<b>26</b>
<b>Figure 10</b> : Charte Pareto de l'effet antibactérien des trois huiles essentielles et leur mélange sur <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<b>27</b>
<b>Figure 11</b> : Surface de réponse de l'effet antibactérien (diamètre de la zone d'inhibition des 3 huiles essentielles et leur mélange sur <i>A.vitis</i> )	<b>28</b>
<b>Figure 12</b> : Charte Pareto de l'effet antibactérien des trois huiles essentielles et leur mélange sur <i>A.vitis</i>	<b>29</b>
<b>Figure 13</b> : analyse en composante principale pour le diamètre des zones d'inhibition des trois bactéries en fonction des trois huiles essentielles et leurs mélanges	<b>29</b>
<b>Figure 14</b> : % d'inhibition des huiles essentielles seules et du mélange des trois phytopathogènes par apport aux antibiotiques.	<b>31</b>



## Introduction

Le verger arboricole national occupe actuellement une superficie de plus de 50.000 ha. Le secteur des rosacées fruitières est caractérisé par une gamme diversifiée d'espèces, c'est aussi un secteur important de l'agriculture marocaine, grâce à leur production d'une part et en terme de création d'emploi d'autre part. Comme toutes les cultures, les rosacées sont en proie à des pathologies d'origine microbienne. Parmi ces phytopathologies, le feu bactérien et la galle du collet. Le premier est causé par la bactérie *Erwinia amylovora* et il est considéré comme la maladie la plus destructive qui touche les Rosaceae à pépins. Le deuxième est causée par les bactéries *Agrobacterium tumefaciens* et *Allorhizobium vitis*. *Agrobacterium tumefaciens* est l'une des bactéries phytopathogènes les plus destructives causant d'importantes pertes au niveau des pépinières. *Allorhizobium vitis* est la bactérie responsable de la maladie de la galle du collet uniquement chez la vigne.

Ces phytopathogènes affectent la croissance, la productivité et le rendement des arbres cultivés ce qui entraînent des problèmes au niveau agricole, environnemental et économique.

Face à ces enjeux, des moyens de lutte sont envisagés. La lutte chimique qui consiste à utiliser des pesticides conventionnels en agriculture est de plus en plus remise en cause en égard à leurs nombreux impacts négatifs sur l'environnement, la santé animale et l'homme. Ainsi donc, la recherche de solutions alternatives revêt d'une importance capitale pour la communauté scientifique.

Parmi ces solutions, les huiles essentielles (HE) sont de plus en plus prisées. En effet, Les HE sont des molécules odorantes synthétisées par des plantes aromatiques et connues depuis longtemps pour leur activité antiseptique et leur activité thérapeutique dans la médecine populaire. Elles sont beaucoup utilisées puisque, selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) 80% de la population mondiale a recours à la médecine traditionnelle pour satisfaire aux besoins en soins de santé primaire.

Par ailleurs, le Maroc figure parmi les principaux pays producteurs d'huiles essentielles du fait d'une part de sa diversité géographique et climatique qui lui procure un large éventail d'espèces végétales, dont 400 plantes aromatiques et d'autre part en raison de la préservation de techniques de distillation développées par les arabes. Ce qui fait du Maroc une ressource importante en plantes aromatiques médicinales (PAM) notamment en HE.

Fort de tout ce qui précède, il est impérieux pour notre pays, de valoriser les phytoressources en disposant de données scientifiques à même de corroborer l'activité antimicrobienne des HE longtemps véhiculée.

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre étude dont le thème est : « Etude de l'activité antibactérienne de certaines huiles essentielles sur *Allorhizobium vitis*, *Agrobacterium tumefaciens* et *Erwinia amylovora* ».

Le but de cette étude est de montrer l'intérêt que peut prendre l'Aromathérapie dans le soin des pathologies d'origine bactérienne, qu'elles soient utilisées seules ou en association.

Nous débuterons ce projet de fin d'études par un rappel des généralités sur les plantes aromatiques et médicinales, puis sur les huiles essentielles et enfin sur l'activité antibactérienne et les principales bactéries phytopathogènes étudiées.

Nous présenterons ensuite nos travaux sur l'étude de l'activité antibactérienne *in vitro* de certaines huiles essentielles ainsi que de quelques mélanges réalisés en laboratoire sur les trois germes disponibles au laboratoire : *Agrobacterium tumefaciens*, *Allorhizobium vitis* et *Erwinia amylovora*. Nous terminerons par une comparaison de ces résultats entre eux.

Une conclusion générale résumera l'ensemble des résultats issus de cette étude et présentera les perspectives de recherche concernant toutes les étapes à réaliser dans un futur proche.

## Partie I : Revue bibliographique

### A: Plantes Aromatiques et Médicinales

#### 1. Terminologie

**Phytothérapie** : c'est un mot d'origine grecque : « phyto » qui veut dire plante et « therapeuein » veut dire soigner, autrement dit c'est la thérapeutique par les plantes ; c'est l'utilisation des extraits de plantes et les principes actifs naturels dans le but de soulager, guérir ou prévenir une maladie [1, 2,3].

**Aromathérapie** : c'est une branche de la phytothérapie, elle consiste en l'utilisation des extraits aromatiques des plantes (essences et huiles essentiels) [1,4].

**Plante médicinale** : est une plante dont l'un de ses organes possède des activités pharmacologique, pouvant conduire à des emplois thérapeutiques. On utilise en généralement qu'une partie de la plante : la racine, la feuille, la fleur, la graine, la plus riche en principes actifs [5].

**Plante aromatique** : c'est une plante ou substance ayant des propriétés outre que médicamenteuse. Elle est utilisée en cuisine et en médecine douce pour les arômes qu'elle dégage, et ses huiles essentiels que l'on peut extraire. Une plante aromatique peut être médicinale, mais une plante médicinale n'est pas aromate [5,6].

#### 2. Historique

L'histoire des plantes aromatiques et médicinales est associée à l'évolution des civilisations. Dans toutes les régions du monde, l'histoire du peuple montre que ces plantes ont toujours occupé une place importante en médecine, dans la composition des parfums et dans les préparations culinaires. L'utilisation des arômes est connue depuis longtemps pour des usages religieux, cosmétique mais aussi thérapeutique [7].

Ce sont les égyptiens avant Jésus-Christ qui sont les premiers à avoir recours aux plantes aromatiques pour embaumer les morts [8,9]. En Grèce archaïque, Hypocrate montrait les bains aromatiques dans le traitement des maladies de la femme. Et dans les grandes épidémies en faisant brûler des PAM telles que la lavande, romarin [7]. En Inde, ils ont utilisé les PAM pour différentes indications : massage, santé, hygiène bain et diététique [7,10]. En 1<sup>er</sup> siècle apparaît une thèse sous-titrée «de materia medica» écrite par le médecin DIOSCORIT. Cette dernière va être comme une référence dans la communauté Romaine et Arabe. Les arabes ont

ainsi poursuivi les recherches sur les PAM en devenant les premiers à mettre au point la distillation des plantes, permettant d'en extraire l'Huile Essentielle (HE) [11]. Cependant avec l'avancement de la science et l'émergence de la pharmacologie synthétique, les médicaments chimiques commencent à se répandre par contre la phytothérapie et l'aromathérapie ont perdu leur intérêt. Mais, depuis le début des années 2000, il a eu une résurgence de cette discipline. En effet, la prise de conscience par les patients et les médecins d'une image de plus en plus défavorables des médicaments chimiques suite à l'apparition des effets indésirables et l'apparition de la résistance bactérienne a renvoyé à nouveau vers l'usage des produits naturels à base de plantes médicinales et aromatiques qui semble avoir de grands avantages .

### 3. Plantes aromatiques et médicinales étudiées

**Tableau 1** : Plantes aromatiques et médicinales

Plante	Nom scientifique	Organe utilisée	Composant majoritaire
<b>Origan</b>	<i>Origanum compactum L.</i>	Partie aérienne	$\gamma$ -terpinene (25.11%), Carvacrol (22.29%), Thymol (19.21 %), p-cymene (18.68 %)
<b>Thym</b>	<i>Thymus vulgaris L.</i>	Partie aérienne	Thymol (42.01%), P-Cymene (14.34%), $\gamma$ -Terpinene (12.04%), Carvacrol (5.07%)
<b>Cannelle</b>	<i>Cinnamomum verum J.Presl</i>	L'écorce	Cinnamaldehyde, cinnamyl acétate, linalol Alpha-pinéne
<b>Armoise</b>	<i>Artemisia vulgaris L.</i>	Partie aérienne	Vulgarine, dérivés caumarique, tri terpènes et stéroïls
<b>Romarin</b>	<i>Rosmarinus officinalis L.</i>	Partie aérienne	Acide rosmarinique, Rosmaridiphénol
<b>Cumin</b>	<i>Cuminum cyminum L.</i>	Semences	Cuminaldéhyde (20-40%) Gamma-terpinéne, bêta-pinéne, para-cyméne
<b>Menthe Pouliot</b>	<i>Mentha pulegium L.</i>	Partie aérienne	Alpha pinéne, limonène, menthone, pulégone
<b>Laurier</b>	<i>Laurus nobilis L.</i>	Feuilles	Linalol, bornéol, 1.8 cinéol Eugénol, linalol, sabinéne

## **B: Huiles Essentielles**

### **1. Définition**

Une huile essentielle est un liquide concentré en substances végétales, obtenu par extraction ou par distillation de molécules volatiles de la plante d'origine. Selon la pharmacopée européenne [12] : « Produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement par la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, ou par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition».

### **2. Répartition des huiles dans la plante**

Les feuilles, les fleurs, le bois, les racines, les rhizomes, les fruits et les graines sont les organes de la plante aromatique qui peuvent stocker des huiles essentielles. Cependant l'accumulation et la synthèse des huiles essentielles consiste sur la présence des structures histologiques spécialisées, ces structures souvent se localisent soit sur ou à la surface de la plante : cellules à huiles essentielles des Lauracées, poils sécréteurs des Lamiacées, des poches sécréteurs des Rutacées, canaux sécréteurs des Apiacées ou Asteracées. Les tissus sécréteurs peuvent exister simultanément chez la même espèce, dans le même organe [13].

Les plantes qui ne possèdent pas des trichomes glandulaires, synthétisent et accumulent seulement les traces de mono terpènes, ou ces glandes sont les sites primaires de la biosynthèse d'huile essentielle.

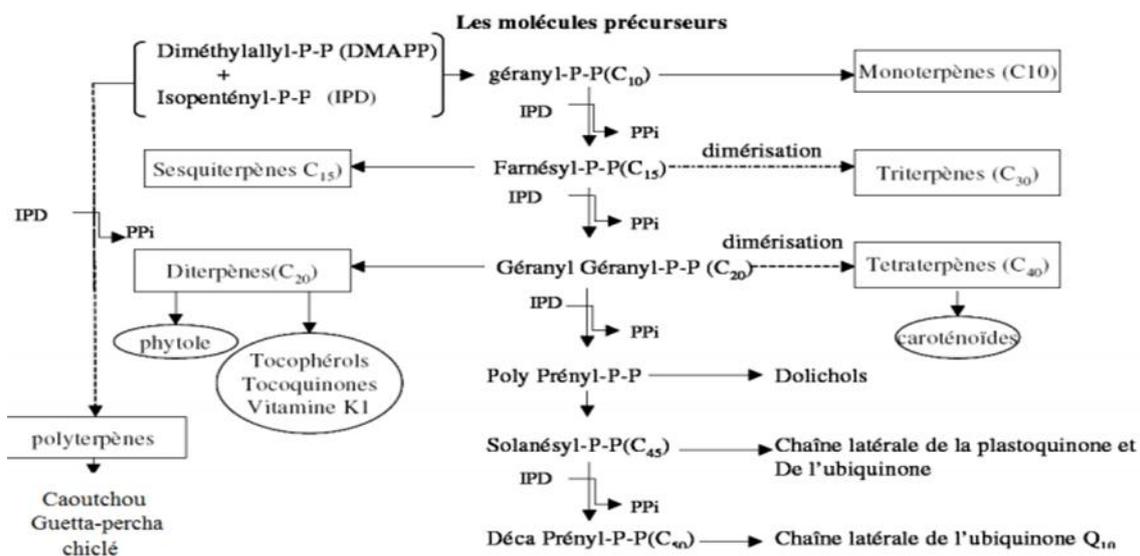
### **3. Biosynthèse**

Les huiles essentielles sont produites au cours du métabolisme secondaire des plantes, Elles interviennent dans le mécanisme de défense de la plante mais n'interviennent ni pour sa croissance ni pour la production de la matière organique. Ces huiles essentielles se composent généralement de :

- 1- Matériaux volatils synthétisés à partir du précurseur isopentenyl pyrophosphate (IPP), ces matériaux se composent de mélanges complexes de mono-sesquiterpènes et des matériaux oxygènes dérivés de ces mélanges complexes [13].
- 2- Phényle propanoïdes de la voie acide Shikimique, et leurs produits de biotransformation.

Les terpènes sont la famille la plus répandue chez les plantes, leur particularité structurale se caractérise par la présence d'une unité isoprénique de 5 atomes de carbone ( $C_5H_8$ ) dans leur squelette. Cet isoprène est à la base du concept de la « règle isoprénique », cette dernière considère le di-phosphate d'isopentényl, désigné sous le nom d'isoprène actif, comme le véritable précurseur de la molécule terpénique. Les terpènes désignent sous le nom d'isoprénoides.

Les mono terpènes sont volatils, peuvent être évaporés à la vapeur d'eau. D'odeur souvent agréable et représentent la majorité des constituants des huiles essentielles [13].



**Figure 1 :** Synthèse de différentes classes terpéniques chez les plantes

#### 4. Caractères physico-chimiques des huiles essentielles

Les propriétés physico-chimiques des huiles essentielles forment un groupe très homogène, les principales caractéristiques sont :

Aspect liquide, Volatiles et très rarement colorées, une densité faible pour les HE riche en mono terpènes, n'ont pas les touches grasses et onctueuses des huiles, solubles dans les alcools à titre alcoométrique élevé et dans la plupart des solvants, douées d'un pouvoir reptatoires, un indice de réfraction variant essentiellement avec la teneur en mono terpènes et en dérivés oxygènes, Très altérables, sensibles à l'oxydation et ont tendance à se polymériser donnant lieu à la formation de produits résineux, il convient alors de les conserver à l'abri de la lumière et de l'humidité[14].

## 5. Contrôles de qualités

L'Institut de Normalisation Scientifique d'Aromatologie INSA a retenu trois critères pour conférer aux huiles essentielles de label «HEBBD» : Huile Essentielle Botaniquement et Biochimiquement Définie. Il s'agit de :

### L'espèce botanique : [15, 16]

Il s'agit du nom latin complet de la plante distillée à l'origine de l'extraction de l'huile essentielle. Par exemple, dans le terme « lavande », il y a plusieurs espèces dont on extrait des huiles essentielles différentes. Le nom complet sera composé par conséquent :

- Du genre : ex : *lavandula*
- D'une épithète qualitative : ex : *spica, vera...*
- Et parfois de la variété si elle existe : ex : *var fragans*

### L'organe producteur :

Selon l'organe producteur, l'huile essentielle peut avoir des propriétés et un usage totalement différents. C'est le cas de l'oranger amer : *citrus aurantium var. amara* qui fournit différentes huiles essentielles, l'une à partir de ses feuilles, une autre à partir de ses fleurs, ainsi qu'une essence extraite de l'écorce des zestes de ses fruits. Ces 3 substances aromatiques diffèrent par leur composition, leur parfum, leurs propriétés médicinales... [16].

### Le chimiotype de la plante :

Il indique le composant biochimique majoritaire et distinctif présent dans l'huile essentielle. Il permet ainsi de différencier entre les huiles essentielles extraites d'une même espèce botanique mais de composition biochimique différente et par conséquent aux propriétés différentes [15].

Le chimiotype est retrouvé grâce à une analyse chromatographique et spectrométrique identifiant les molécules contenues dans l'huile essentielle.

## 6. Procédés d'extraction des huiles essentielles

Pour obtenir un litre d'huile essentielle il faut parfois plusieurs tonnes de plantes. En effet la quantité d'huile essentielle contenue dans la plante est très faible. Il existe différentes méthodes d'extraction : techniques traditionnelles et techniques modernes ou bien appelées vertes.

Mais le choix de la méthode utilisée définit obligatoirement la nature de l'essence ainsi que son éventuelle utilisation. L'hydro distillation ou l'entraînement à la vapeur d'eau de la plante sèche ou fraîche reste la technique la plus utilisée.

## 6.1 Méthodes traditionnelles

Ces techniques sont celles utilisant les procédés de base les plus simples, par l'intermédiaire de l'eau ou de l'huile.

- **Infusion** : c'est la méthode d'extraction des principes actifs contenus dans la substance végétale par dissolution des parties fraîches ou sèches dans un liquide (eau) initialement bouillant (100° C) que l'on laisse refroidir environ 20 min, on filtre et on obtient un infusé [5].
- **Décoction** : Elle est utilisée pour les parties dures de la plante. On chauffe l'eau à température d'ébullition avec la plante. On maintient pendant 15 min. On arrête le feu, on laisse couvert 5 min et on obtient un décocté [5].
- **Macération** : Elle est utilisée pour les drogues dont les PA peuvent s'altérer à chaud et qui sont solubles à froid ou pour éviter la dissolution des pectines à chaud (gélatine). On utilise des drogues à gomme ou mucilages (racine, bois, écorces...). On verse l'eau à température ambiante sur la plante. On laisse en contact 30 min à 4 heures (parfois jusqu'à 12 heures). On filtre et on obtient un macéré [5].
- **Distillation** : elle consiste à utiliser la vapeur d'eau pour récupérer les principes volatils. Elle permet de séparer les constituants d'un mélange homogène.
  - **Hydro distillation** : c'est la technique d'extraction des huiles essentielles la plus utilisée. Dans ce cas la plante est en contact directe avec l'eau bouillante, le chauffage permet l'éclatement et la libération des molécules volatiles contenues dans la matière végétales [17].
  - **Pression à froid** : l'extraction se fait sans source de chaleur. Les plantes sont pressées à froid. cette méthode est utilisée uniquement pour les agrumes [17].
  - **Entraînement à la vapeur d'eau** : c'est le même procédé que l'hydro distillation sauf qu'ici la plante n'est pas en contact avec l'eau, mais la vapeur d'eau qui détruit les cellules végétales afin de libérer les molécules odorantes.

## 6.2 Méthodes d'extraction modernes

- **Extraction par CO<sub>2</sub> supercritique**

Cette technique consiste à traiter la matière végétale avec un solvant qui est le CO<sub>2</sub> supercritique. Le choix du CO<sub>2</sub> est lié à ses propriétés notamment ses coordonnées critiques (T<sub>c</sub>=31,1, P<sub>c</sub>= 7038 MPa). Le CO<sub>2</sub> a en plus d'avantage d'être non toxique, non combustible et naturels [17].

- **Extraction assistée par micro-onde**

L'utilisation des micro-ondes implique une interaction directe entre le rayonnement électromagnétique et la matière végétale, pour extraire des produits naturels comparables aux huiles essentielles et aux extraits aromatiques [17].

## 7. Composition chimique et variabilité des huiles essentielles

Les huiles essentielles présentent une très grande variabilité, au niveau de leur composition, ainsi qu'au plan du rendement des plantes d'origines. Cette variabilité peut s'expliquer par différents facteurs. L'environnement, le génotype, l'origine géographique, la période de récolte, lieu de séchage, la température et la durée de séchage, les parasites, les virus et mauvaises herbes sont des facteurs qui peuvent influencer la composition chimique et le rendement en huiles essentielles. L'action des huiles dépend de l'effet combiné de leurs composés actifs et inactifs, les composés inactifs pourraient influencer la disponibilité biologique des composés actifs et plusieurs composés actifs pourraient avoir un effet synergique.

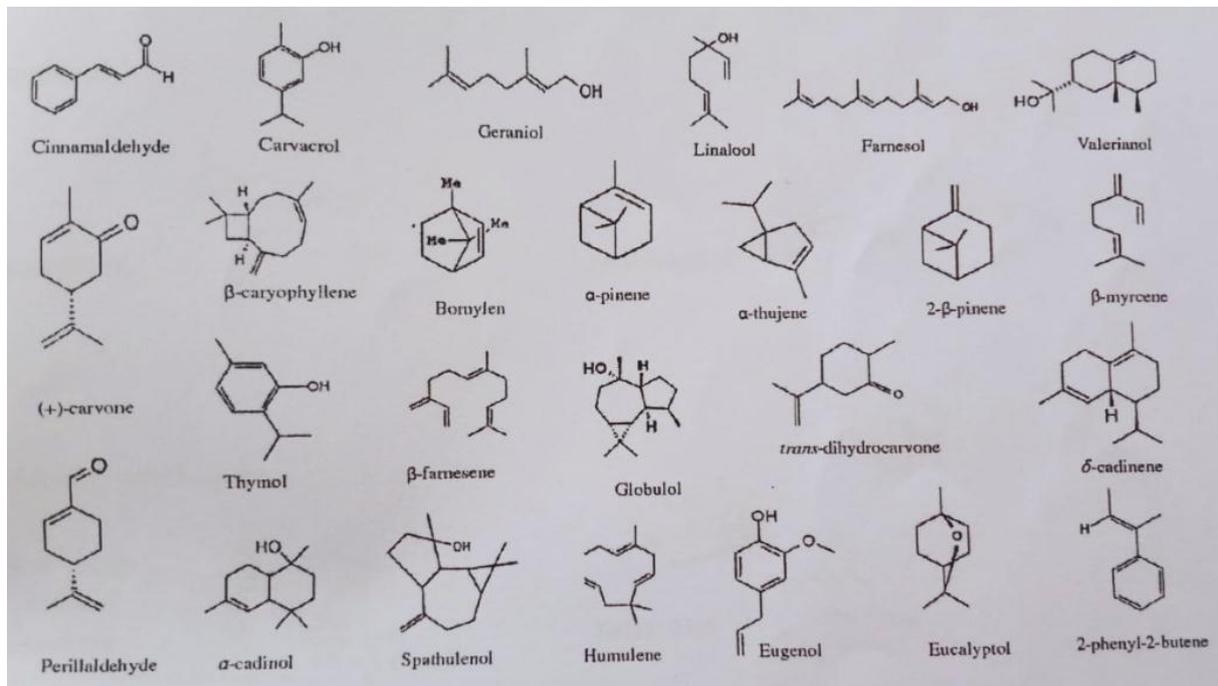
Les conditions principales qui contrôlent une production en huile essentielle sont : bon matériel végétal, variété de la plante, le sol, équipement de distillation, le climat [13].

L'étude de la composition chimique est généralement effectuée par :

Chromatographie en phase gazeuse CPG, Chromatographie sur couche mince (CCM), chromatographie en phase couplée à la spectrométrie de masse CPG-SM, La résonance magnétique nucléaire RMN, La chromatographie liquide à haute performance CLHP.

Les compositions chimiques des huiles essentielles incluent de grande famille de formule générale (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>)<sub>n</sub> : les composés terpéniques et les composés aromatiques dérivent du phénylpropane. Les composés terpéniques formés d'unités isopréniques (en C<sub>5</sub> par exemple les mono terpènes (en C<sub>10</sub>) les sesquiterpènes (C<sub>15</sub>) les di terpènes (C<sub>20</sub>). Ils proviennent de

la même origine métabolique. Ces hydrocarbures donnent des dérivés oxygénés incluant des alcools, des aldéhydes, des esters, des éthers, des cétones, des phénols et des oxydes. Les scientifiques estiment qu'il y a plus de 1000 terpènes et 3000 de structures sesquiterpènes. Cependant, les autres composés des huiles contiennent des phenylpropanes et des composés spécifiques contenant le soufre ou l'azote [18].



**Figure 2 :** Exemple de structures des huiles essentielles présentant une activité antibactérienne

## 8. Toxicité des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont très efficaces mais aussi très dangereuses. La toxicité provient de la présence de certaines molécules aromatiques pour lesquelles des risques ont été identifiés. Une famille biochimique particulière, celle des cétones, est ici particulièrement visée : elle présente une neurotoxicité et un risque abortif. La famille des phénols (la peau et le foie), les HEs contenant les furocoumarines et pyrocoumarines. Enfin, l'absorption orale d'huiles essentielles riches en mono terpènes (toutes les espèces de pins et de sapins, de genévriers et même le santal blanc) sur de longues périodes peut enflammer et détériorer à terme, les néphrons. [19,20]. Les huiles essentielles doivent être prises à bon escient et à doses adaptées afin d'éviter de dommageables effets secondaires, parce que l'efficacité et la toxicité ce n'est souvent qu'une question de quantité [21,22].

## **C : Activité antibactérienne des huiles essentielles**

### **1. Bactéries phytopathogènes étudiées**

#### ***1.1 Erwinia amylovora***

Bactérie à Gram négatif appartient à la famille des Enterobacteriaceae. C'est la bactériose responsable de la maladie du feu bactérien qui affecte les Maloïdées (pommier, poirier, aubépine, Pyracantha, amélanchier...).

La phytopathogénicité de cette bactérie s'explique par son aptitude à contourner le mécanisme de défense des plantes. *E. amylovora* possède un système la rendant agressive. Il s'agit du système d'acquisition du fer. Ce système est important pour la survie de la bactérie en milieu carencé en fer comme l'apoplaste [31].

De plus d'autres facteurs notamment d'ordre génétique renforcent ce pouvoir pathogène de cette bactérie. Cela s'explique par le fait que la bactérie possède des gènes qui sont impliqués dans la sécrétion de protéines effectrices dans le cytosol des cellules végétales hôtes [32].

#### ***1.2 Agrobacterium tumefaciens***

L'*Agrobacterium tumefaciens* est une bactérie à Gram négatif qui appartient à la famille des Rhizobiaceae et qui est l'agent causal de la maladie de la galle du collet qui attaque les pipières. La pathogénicité d'*Agrobacterium tumefaciens* est un processus unique et spécialisé incluant le transfert de l'information génétique entre la bactérie et la plante. L'élément génétique responsable du pouvoir pathogène chez *Agrobacterium* est un fragment d'ADN circulaire appelé : plasmide Ti qui code pour l'information génétique « Tumor inducing ». [33]

#### ***1.3 Allorhizobium vitis***

Bactériose à gram négatif qui provoque la même maladie qu'*Agrobacterium tumefaciens* mais uniquement chez la vigne. Cette bactérie est souvent présente de manière native dans certains sols, elle nécessite une blessure récente non cicatrisée de la plante hôte pour permettre l'infection. Une fois à l'intérieur, elle pirate l'ADN de la cellule Végétale ou elle introduit une portion de son plasmide Ti ( Tumor Inducting ) l'ADN-T dans le génome de la cellule hôte afin que celle-ci secrète des molécules nécessaires pour sa multiplication qui sont les opines. L'ADN-T code aussi pour la production des phytohormones qui sont responsables de

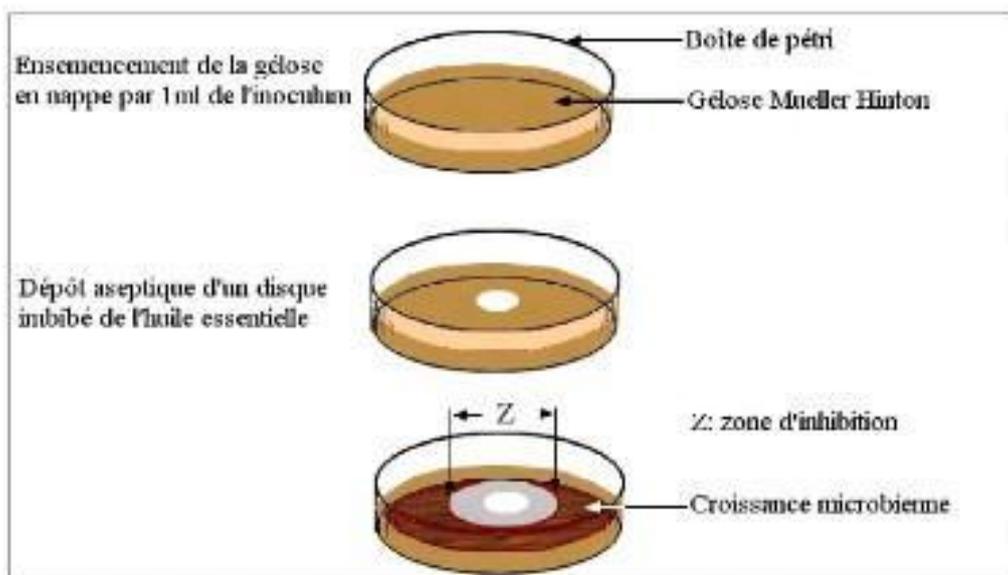
prolifération des cellules désordonnées formant ainsi des Tumeurs qui sont le plus souvent formées au niveau du collet de l'arbre. [34].

## 2. Généralités sur le pouvoir antibactérien des huiles essentielles

L'activité antibactérienne a deux effets sur les microorganismes ; le premier est bactéricide c'est-à-dire il exerce une activité létale et le deuxième est dite bactériostatique qui entraîne une inhibition de la croissance.

La détermination du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles fait appel à plusieurs techniques expérimentales.

Une première étape consiste à faire un «screening » ou une sélection des huiles ayant un effet antimicrobien potentiel. Il s'agit d'une étude préliminaire qualitative. A cette étape on peut utiliser comme techniques : L'aromatogramme, technique de diffusion en puits.



**Figure 3 :** Halo d'inhibition de croissance bactérienne sur gélose.

Une seconde étape consiste à calculer quantitativement le degré d'activité antimicrobienne des huiles essentielles sélectionnées, et ce en déterminant la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) de ces huiles.

La CMI se définit comme la plus faible concentration en principe actif capable d'inhiber toute croissance bactérienne en 24 h [23]. La CMB correspond à la concentration en principe actif permettant de tuer 99,9 % des bactéries en 24 h.

On peut utiliser comme technique : Technique de diffusion en milieu solide, techniques de diffusion en milieu liquide (Test de micro- dilution, Test de macro- dilution) et technique de diffusion en phase vapeur (Méthode des micro-atmosphères).

Plusieurs études ont été réalisées sur le pouvoir antimicrobien des HEs. On note l'étude faite par Chamberland en 1887 de l'activité antimicrobienne des essences de cannelle, d'origan et de girofle [24], et qu'en 1919 Gatte Fosse a montré que le bacille de Koch était détruit en 5 minutes par une émulsion à 1% D'huile de pin.

**Tohidpour et al. (2010)**, ont rapporté l'effet antibactérien des huiles essentielles de *Thymus vulgaris* L. (Lamiaceae), *Eucalyptus globulus* Labill. (Myrtaceae) sur les *Staphylocoque Dorés Résistant* à la Mécililine (SARM) avec des concentrations minimales inhibitrices estimées à 18,5 µg/mL et 85,6 µg/mL, respectivement [25].

**Kirmizibekmez et al., (2009)**, ont montré la sensibilité des SARM vis-à-vis de l'action de l'huile essentielle de *Lavandula stoechas* L. sp stoechas (CMI= 31,2 µg/mL) [26].

Ultée et coll. [27,28] ont montré l'effet bactéricide du carvacrol sur *Bacillus cereus* dans les aliments. Didry [29] a montré l'effet antimicrobien du thymol et du carvacrol, utilisé individuellement ou en combinaison sur des germes d'infection respiratoire. Juven et coll ont obtenu une diminution importante des cellules vivantes de *Salmonella thyphimirum* en le traitant par l'huile de thym et ses constituants actifs [30]. Récemment, une étude in vitro a montré l'effet antiviral de l'HE d'origan et du girofle sur le virus Type 1 de l'herpès simplex ainsi que sur le virus de la maladie de Newcastle [23].

## DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODE

### 1. Matériel végétal

Le matériel végétal était constitué de quatre (04) extraits d'huiles essentielles (HE) issus respectivement des plantes *Cuminum cyminum*, *Origanum compactum*, *Thymus vulgaris*, *Artemisia vulgaris*.

### 2. Matériel microbiologique

L'activité antibactérienne des huiles essentielles a été évaluée sur trois souches bactériennes ; une souche d'*Allorhizobium vitis* de référence S4 qui a été isolée dans l'institut de recherche en viticulture et œnologie à Hongrie par Szegedi et al.(1988) , une souche d'*Agrobacterium tumefaciens* de référence C58 séquencée en 2001 par Goodner,et al.(2001) et de nouvelles souches d'*Erwinia amylovora* isolées à partir des échantillons de pommier et de poirier issus de plantation du moyen atlas.

### 3. Evaluation de l'activité antibactérienne des HEs étudiées

Pour évaluer l'activité antibactérienne de nos HE, nous avons déterminé leur diamètre d'inhibition par diffusion des disques ensuite déterminer leur concentration minimale inhibitrice (CMI) en milieu liquide, enfin nous avons déterminé leur concentration minimale bactéricide (CMB) en milieu gélosé. Par ailleurs, nous avons fait un antibiogramme pour mieux appréhender le pouvoir inhibiteur de nos huiles essentielles par rapport à des antibiotiques spécifiques aux bactéries utilisées avec (le streptomycine, le rifampicine ) et on a réalisé aussi un aromatoگرامme avec ; ( les HEs d'*origan*, *cannelle*, *Thym* ,*Romarin* , *Menthe pouliot* , *Cumin* , *Armoise*, *Laurier* et le mélange des huiles d'*origan* , *cannelle* et *cumin*). Toutefois, toutes ces opérations ont été précédées de l'extraction des huiles essentielles de nos plantes (*Origan*, *Cumin*, *Thym*, *Armoise*).

### 4. Extraction des huiles essentielles

Pour obtenir nos extraits d'HE, nous avons réalisé l'hydro distillation. En effet, nous avons découpé les feuilles de nos plantes en petits morceaux puis, nous les avons mises en suspension dans le ballon. A l'aide de la plaque chauffante nous avons chauffé le ballon et maintenu la température à 100°C ; puis, nous avons ouvert le robinet d'eau de sorte qu'il refroidisse le réfrigérant. De même nous avons recouverts d'aluminium les capillaires gradués du Clevenger afin que l'huile soit protégée de la lumière. La distillation aqueuse a été maintenue pendant 3 heures et l'hydrolat est récupéré dans un flacon ; tandis que le mélange d'eau et d'huile est recueilli dans le tube à essai et laissé à décanter afin de séparer l'huile de

l'eau car l'huile étant non miscible à l'eau, nos HE sont à la surface et séparées de l'eau. Enfin, nous les avons conservés dans des tubes à essai et recouverts de papier d'aluminium.

La **figure** ci-dessous présente le dispositif utilisé pour l'extraction des HE.



**Figure 4:** Appareil utilisée pour l'extraction des HEs.

## **5. Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles par diffusion en milieu solide**

Elle s'est déroulée en deux étapes à savoir la préparation des cultures microbiennes et la réalisation du test de diffusion sur disque.

### **5.1 Préparation des cultures microbiennes**

Nos souches étant dans des géloses de conservation, nous les avons repiquées dans des boîtes de pétri contenant de la gélose LPGA et incubées à leurs températures optimale pendant 24 h. Ensuite, Nous avons raclées quelques colonies bien isolées de culture pure à l'aide d'une anse de platine stérile. Le contenu de l'anse de platine a été transféré dans des tubes à essai de 9 ml d'eau physiologique stérile et la suspension bactérienne a été homogénéisée à l'aide du vortex, l'opacité de nos suspensions bactériennes a été mesurée au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 625 nm. Les densités optiques obtenues étaient comprises entre 0,08 et 0,15 ce qui correspond à une densité de 0,5 à l'échelle Mc Farland et à une concentration bactérienne de  $10^8$  UFC/ml.

### **5.2 Diffusion sur disque**

La méthode de disques est une technique qualitative qui permet de déterminer la sensibilité des microorganismes vis-à-vis d'une substance réputée antimicrobienne. Cette méthode repose

sur le pouvoir migratoire des extraits à l'intérieur d'une boîte de Pétri, dans un milieu nutritif solide. Nous avonsensemencé 1 ml de suspension microbienne de densité équivalente au standard de 0,5 de Mc Farland dans chaque boîte de Pétri contenant la gélose LPGA. L'excédent de l'inoculum a été ensuite éliminé par aspiration à l'aide d'une micropipette. Nous avons séché nos boîtes de pétri puis déposer des disques de papier Whatman de 6 mm de diamètre préalablement imprégnés de 10 µl des huiles essentielles à la surface de la gélose. Ensuite, Nous avons disposés nos boîtes de pétri à température ambiante pour le pré diffusion. Enfin, nous avons incubé les boîtes de Pétri à 37°C 24 heures à l'étuve. Après l'incubation, le diamètre d'inhibition a été mesuré en millimètres, disques inclus. Nous avons aussi réalisé quelques mélanges d'HE afin de vérifier leur synergie ou antagonisme d'activité antibactérienne.

Dans les mêmes conditions nous avons réalisé un antibiogramme en substituant nos disques imprégnés d'HE par des disques d'antibiotique de streptomycine et rifampicine.

Le pourcentage d'inhibition des huiles essentielles par rapport aux antibiotiques de références pour les bactéries testées est calculé par la relation suivante :

$$\% I = [-1 \times (C-T / C+T)] \times 100$$

Avec :

C = diamètre d'inhibition de l'antibiotique

T = diamètre d'inhibition de l'huile essentielle.

## **6. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) des HE en milieu liquide**

La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration de l'extrait capable d'inhiber toute croissance bactérienne en 24 h. Ainsi pour déterminer la CMI de nos extraits d'huile essentielle nous avons procédé comme suit : d'abord nous avons déterminé les concentrations initiales  $C_i$  de nos HE ; ensuite, nous avons reparti 50µL de milieu LPG dans chaque puits de la microplaque à 96 puits sauf les puits de la première colonne, ces derniers correspondant aux témoins négatifs TN (absence du bouillon nutritif) nous avons ajouté 100 µL d'HE et nous avons réalisé des dilutions successives jusqu'aux puits de la colonne 11. Les puits de la colonne 12 contiennent uniquement le milieu de culture et l'inoculum ce sont des témoins positifs (TP). Enfin nous avons ajouté 50 µL de l'inoculum dans chaque puits de la microplaque et finalement on a mélangé à l'aide de la micropipette et en changeant les cônes à chaque fois. Le volume final, dans chaque puits était de 150 µL et

les témoins négatifs (TN) ne contenaient que l'huile et l'inoculum tandis que les témoins positifs ne contenaient pas d'huile essentielle. Par ailleurs, nous avons réalisé cette même manipulation en utilisant les antibiotiques de référence pour les bactéries utilisées qui sont la streptomycine à 0,024% et la rifampicine à 0,001%. Nous avons incubé la microplaque à 37°C/ 24h. La détermination de la CMI s'est faite par une méthode colorimétrique à l'aide de la résazurine qui est un indicateur du métabolisme des bactéries. En effet en cas de métabolisme bactérien, donc de croissance bactérienne, la résazurine de coloration bleue est réduite en résorufine de coloration rose. Pour ce faire après incubation de la microplaque nous avons ajouté 20 µL de résazurine à chaque puits et incubé à 37°C/ 2h. La détermination de la CMI se fait par cette relation :

$$CMI = \frac{Ci}{2^{n-1}}$$

Avec

Ci : concentration initiale de l'huile essentielle

n : premier puits où il y'a absence de croissance bactérienne

## 7. Détermination de la CMB en milieu solide

La Concentration Minimale Bactéricide (CMB) correspond à la plus faible concentration en extrait capable de tuer plus de 99,9% de l'inoculum bactérien initial. Elle définit l'effet bactéricide d'un extrait. Après avoir observé la dilution à laquelle nous avons déterminé la CMI on retient les 3 dilutions qui la précèdent pour déterminer la CMB sur milieu gélosé et cela en prélevant 10 µl à l'aide d'une anse de platine à partir de ces derniers et en les déposant sur le milieu LPGA 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 extraits ayant montré une absence de croissance. La détermination de la CMB se fait par cette relation :

$$CMB = \frac{Ci}{2^{n-1}}$$

Avec :

Ci : concentration initiale de l'huile essentielle

n=premier puits où il y'a absence de croissance bactérienne

## **8. Analyse statistique**

Toutes les expériences ont été effectuées en triple exemplaire et les résultats ont été rapportés sous forme de moyenne  $\pm$  écart type.

Une analyse de variance (ANOVA) a été appliquée pour déterminer l'ajustement du modèle de régression multiple ( $p < 0,05$ ) afin d'évaluer les effets significatifs des variables et leurs interactions. À partir des coefficients de régression, les graphiques de réponse et de surface de contour du modèle ont été générés. Les analyses ont été effectuées à l'aide de la version gratuite du logiciel STATISTICA version 10 (STATSOFT, INC., 2011).

## TROISIEME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSIONS

### 1. Screening de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles

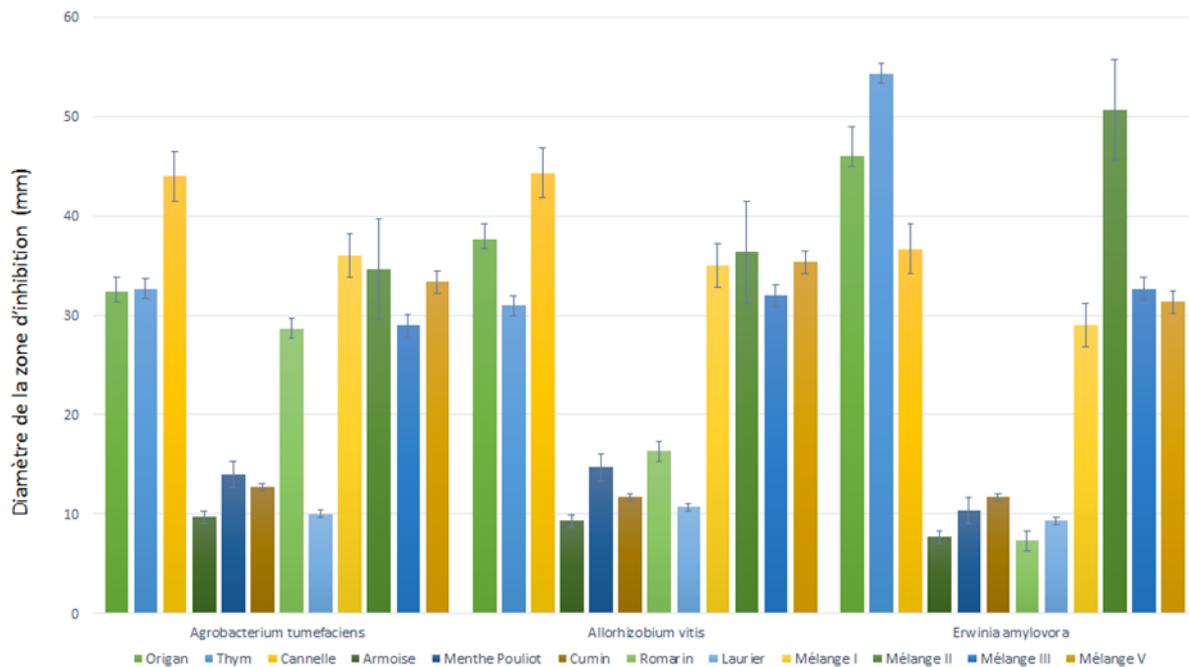
La méthode de diffusion sur disque d'agar a été utilisée pour déterminer les activités antimicrobiennes de l'huile essentielle, puisque ce test s'est avéré être une méthode pratique simple, moins cher et reproductible. Les résultats sont présentés sur la figure 5.

Les résultats ont révélé que les huiles essentielles présentaient une activité antibactérienne avec des amplitudes variables, en fonction de la plante et de l'espèce.

Les plus grandes zones d'inhibition pour *Agrobacterium tumefaciens* ont été obtenues avec les huiles essentielles de cannelle, de thym, d'origan dont les diamètres sont respectivement de  $44 \pm 4,36$  ,  $32,6 \pm 1,8$  et de  $32,3 \pm 1,5$  mm . Ces huiles essentielles ont montré une activité antibactérienne importante dans la mesure que leurs diamètre d'inhibition sont au moins 2,7 fois supérieur à celui de la streptomycine à 0,024% qui est de 12 mm. Par contre des HE telles que le cumin et la menthe pouliot ont affiché une activité plus modérée avec des diamètres d'inhibition respectifs de 12,67 et 14 mm. Quant au Laurier et à l'armoise elles ont montré un diamètre d'inhibition inférieur à celui de la streptomycine.

Sur *Erwinia amylovora*, l'huile essentielle du thym a présenté la plus vaste région d'inhibition avec 54,3 mm suivie de l'origan  $46,00 \pm 3,00$  puis de la cannelle 36,7 mm. Ces valeurs attestent d'une efficacité antibactérienne de ces HE sur *E. amylovora* dans la mesure que des antibiotiques réputés être efficaces notamment la streptomycine à 0,024% a donné un diamètre de 15 mm. Par contre l'armoise était la moins efficace pour inhiber la croissance bactérienne, en présentant le plus petit diamètre d'inhibition 9,3 mm.

En ce qui concerne *Allorhizobium vitis*, l'huile essentielle de la cannelle était la plus efficace en présentant la plus grande zone d'inhibition  $44,33 \pm 2,08$  mm suivie par celle de l'origan avec  $37,67 \pm 1,53$  mm et du thym 31 mm. Ces diamètres d'inhibition mesurés sont supérieurs à ceux obtenus avec la streptomycine 13 mm et la rifampicine 11 mm. A l'inverse des huiles essentielles du laurier 10,7 et de l'armoise 9,3 mm qui ont affiché des diamètres inférieurs à ceux des antibiotiques de référence utilisés.

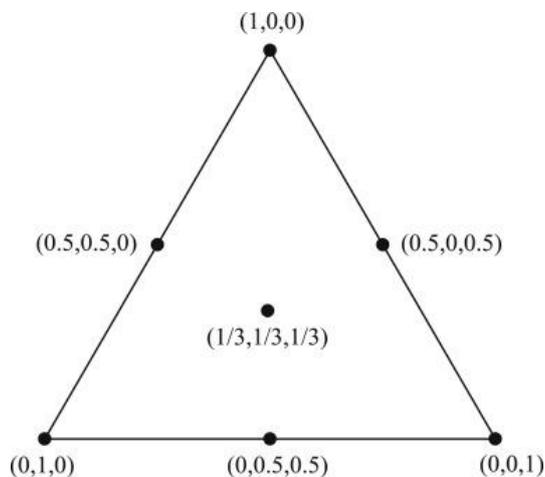


**Figure 5** : Activité antibactérienne des huiles essentielles et de leurs mélanges

## 2. Conception du mélange de surface

Dans le présent travail, la conception simplexe-centroïde a été utilisée. Dans cette conception, différentes conditions testées forment un triangle, avec des composants purs au sommet, représentant 100% de chacun des huiles essentielles. Les points centraux de chaque côté représentant des mélanges binaires ( $1/2: 1/2: 0$ ;  $1/2: 0: 1/2$ ;  $0: 1/2: 1/2$ ), et le point central en tant que mélange ternaire ( $1: 1: 1$ ).

La figure 6 présente toutes les conditions testées. Cette conception permettait l'évaluation de modèles linéaires, quadratiques et cubiques spéciaux pour l'activité antibactérienne, et les résultats sont présentés dans le tableau 2.



**Figure 6** : conception simplexe-centroïde de mélange de surface.

**Tableaux 2 :** Activité antibactérienne des huiles essentielles et de leurs mélanges (zone d'inhibition en mm).

	Cannelle	Cumin	Origan	<i>E. amylovora</i> (DI)	<i>A. tumefaciens</i> (DI)	<i>A. vitis</i> (DI)
1	0	0	100	46.00±3.00	32.33±1.5	37.67±1.53
2	0	50	50	32.67±2.08	29.00±1.00	32.00±3.00
3	0	100	0	11.67±1.53	13.67±1.15	11.67±1.53
4	33.33	33.33	33.33	31.33±0.58	33.33±2.08	35.33±0.58
5	50	0	50	50.67±5.13	34.67±1.53	36.33±1.53
6	50	50	0	29.00±2.00	36.00±1.00	35.00±4.58
7	100	0	0	36.67±2.08	44.00±4.36	44.33±2.08
All Runs				34.00±12.22	31.86±8.96	33.19±9.91

D'après le tableau ci-dessus, on constate que l'effet antibactérien, dépend à la fois de l'huile essentielles utilisée et de l'espèce bactérienne. L'origan a présenté une zone d'inhibition pour *E. amylovora* (46.00±3.00 mm) supérieure à celle trouvées chez *A. tumefaciens* et *A. vitis*. Le même résultat a été observé chez le mélange binaire origan-cannelles (1/2-1/2), bien que la cannelle a été moins effective pour *E. amylovora* comparé au deux autres espèces. D'autre part, on constate que le cumin était moins effectif vis à vis des trois espèces bactériennes comparée aux autres huiles essentielles.

### 3. Analyse de variance (ANOVA)

Afin d'étudier l'aptitude et la signification du modèle, une analyse de variance (ANOVA) a été réalisée. Cette analyse montre également les effets des paramètres individuels et l'interaction des variables du mélange sur les paramètres de réponse, présentés dans le tableau. La valeur F compare la variation des différences entre les réponses moyennes aux points de conception et les réponses estimées correspondantes à l'aide du modèle linéaire, avec la variation expérimentale attendue estimée à partir des points de conception répliqués (erreur pure).

Le modèle linéaire pour *E. amylovora* a expliqué la variance entre les diamètres des zones d'inhibitions au niveau de R<sup>2</sup> avec une fréquence de 89 % et 88% pour R<sup>2</sup>adj. Tandis que le modèle cubique n'était pas significatif (p=0.108 >0.05). Alors que le modèle cubique spéciale a mieux expliquer la variance à un niveau de 97% (R<sup>2</sup> = 0,97). On a aussi constaté que la valeur du R<sup>2</sup> ajusté (0.95) était trop proche de celle de R<sup>2</sup>, indiquant un meilleur ajustement du modèle cubique spéciale permettant ainsi mieux de prédire le comportement des mélanges.

Le modèle quadratique a permis d'expliquer 96% de la variance pour *A. tumefaciens* et *A. vitis*

**Tableau 3 : Analyse Anova**

	SS	Df	MS	F	P	R-Sqr	R-Sqr
<b>Modèle</b>	<b><i>E. amylovora</i></b>						
Linéaire	2656.58	2	1328.29	72.58	0.000000	0.89	0.88
Quadratique	106.98	3	35.66	2.40	0.108045	0.93	0.90
Cubique Spécial	121.11	1	121.11	16.73	0.001102	0.97	0.95
Total ajusté	2986.00	20	149.30				
	<b><i>A. tumefaciens</i></b>						
Linéaire	1323.24	2	661.62	42.33	0.000000	0.82	0.81
Quadratique	216.95	3	72.32	16.85	0.000045	0.96	0.95
Cubique Spécial	1.71	1	1.71	0.38	0.546787	0.96	0.94
Total ajusté	1604.57	20	80.23				
	<b><i>A. vitis</i></b>						
Linéaire	1592.93	2	796.47	38.72	0.000000	0.81	0.79
Quadratique	286.91	3	95.64	17.20	0.000040	0.96	0.94
Cubique Spécial	0.06	1	0.06	0.01	0.919435	0.96	0.94
Total ajusté	1963.24	20	98.162				

#### 4. Analyses des surfaces de réponse

##### a. Analyse de surface de l'activité antibactérienne contre *E. amylovora*

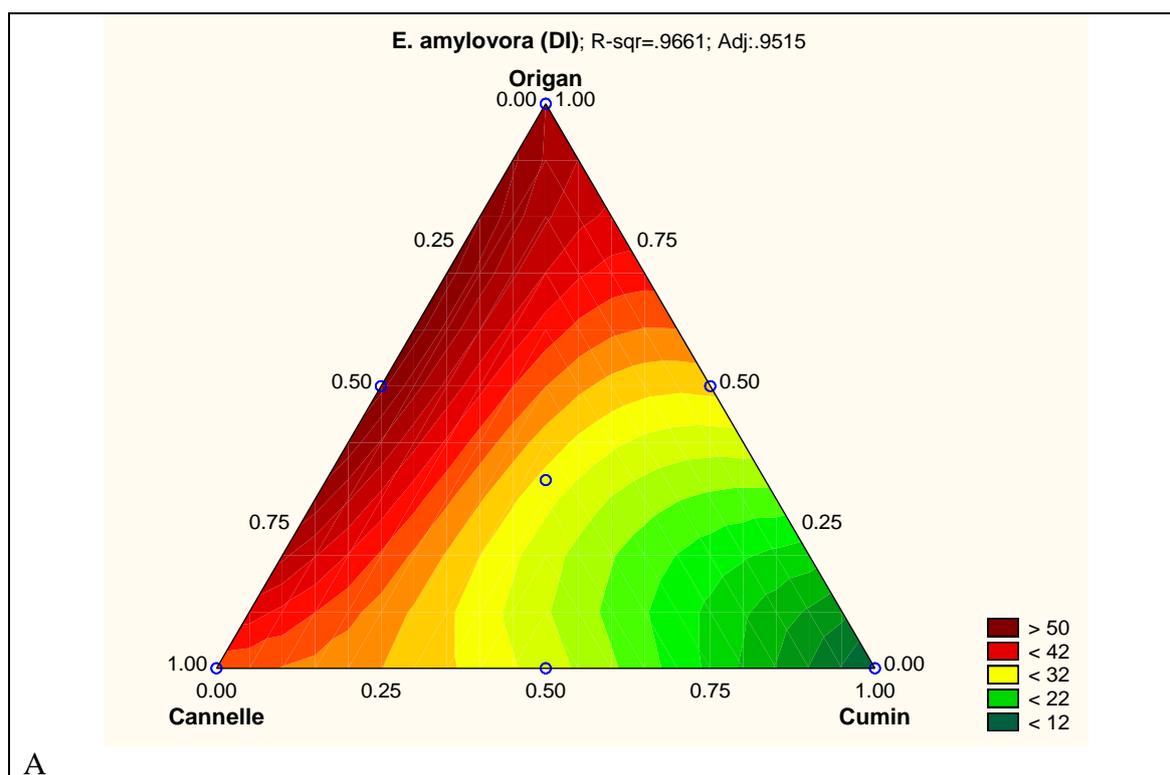
Dans le but Pour étudier les effets interactifs des variables (les trois huiles essentielles) sur l'activité antibactérienne de surface tridimensionnelles ont été construites. Les modèles linéaires, quadratiques et cubiques spéciaux ont été testés et le modèle cubique spécial a été choisi pour décrire la composition du mélange. Les surfaces de réponse obtenues pour le diamètre des zones d'inhibitions par la conception du mélange en fonction des huiles essentielles pures et de leurs mélanges sont illustrées à la figure 7.

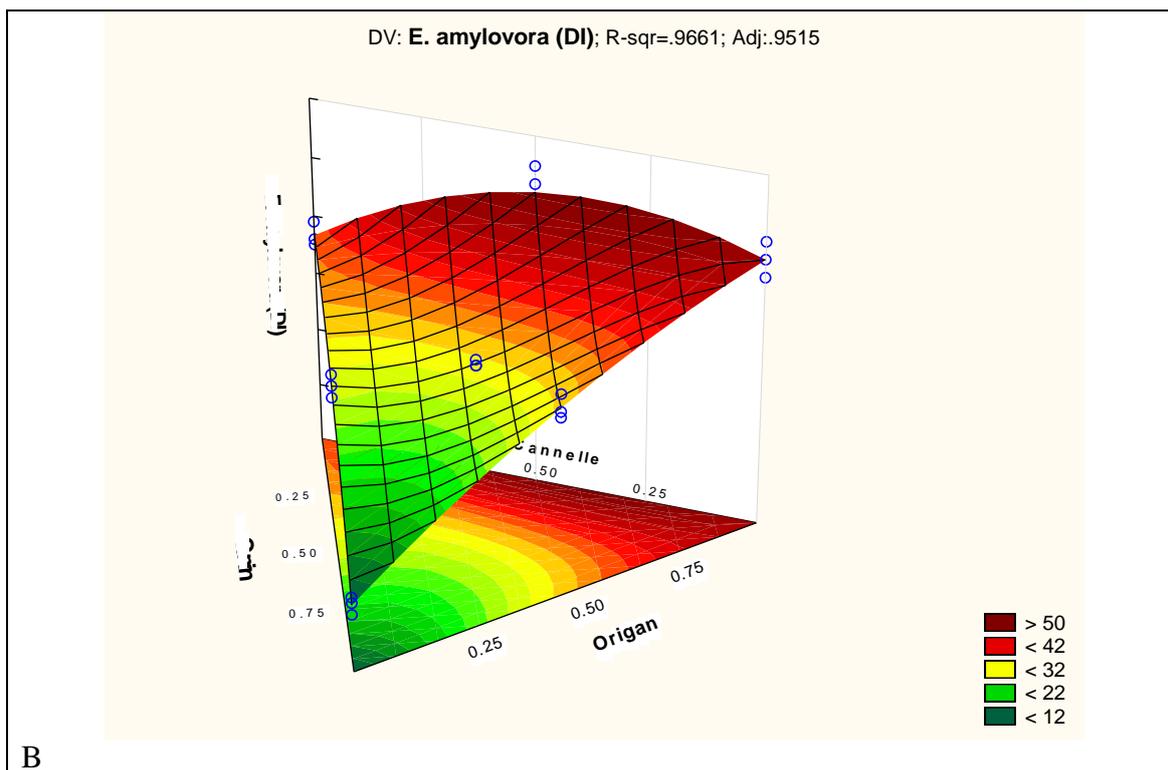
Lorsque les huiles essentielles pures ont été étudiées, la meilleure activité a été observée pour l'HE de l'origan. Une activité intermédiaire a été observée pour la cannelle, tandis que le cumin présentait la plus faible activité antibactérienne contre *E. amylovora*.

Tous les mélanges expérimentaux obtenus avaient une activité antibactérienne plus élevée que celle du cumin pur. On observe aussi que l'ajout de l'huile essentielle de l'origan ou de la cannelle à l'huile essentielle du cumin augmente sa capacité antibactérienne. Aussi, l'ajout de l'origan à tous les mélanges a également entraîné une activité antibactérienne plus élevée.

L'interaction binaire entre l'huile essentielle de l'origan et de la cannelle, avait une influence positive sur la capacité antibactérienne du mélange.

En effet, un effet synergétique significatif entre les huiles essentielles d'origan et de la cannelle a été trouvé contre *E. amylovora*. Ainsi, la meilleure combinaison pour un effet antibactérien contre cette espèce est un mélange des deux huiles avec les proportions suivantes (origan 70%, cannelle 30%)



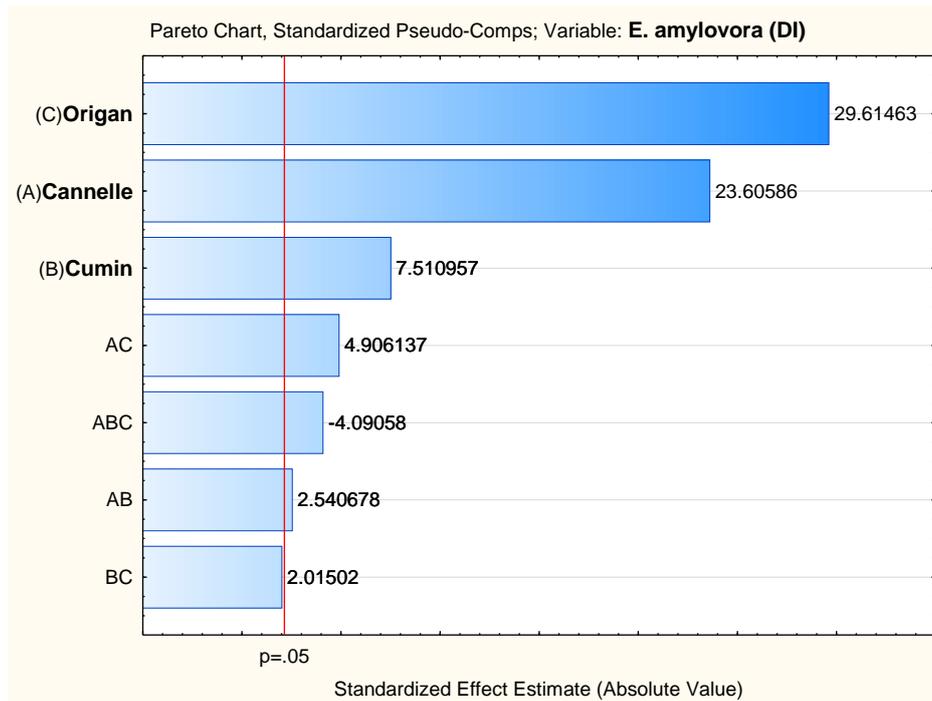


**Figure 7:** Surface de réponse de l'effet antibactérien (diamètres de la zone d'inhibition) des trois huiles essentielles et leurs mélanges sur *E. amylovora*

Afin d'examiner l'importance relative des principaux effets et leurs interactions avec la signification statistique ( $p < 0,05$ ) des trois huiles essentielles sur *E. amylovora*, le graphique de Pareto standardisé (**Figure 8**) a été utilisé.

Selon **la figure 8** les principaux facteurs Cannelle (A), Cumin (B), Origan (C) et leur interaction binaire (AB, et AC) et les intégrations ternaires (ABC) qui dépassent la ligne de référence étaient significatifs au niveau de  $p = 0,05$ .

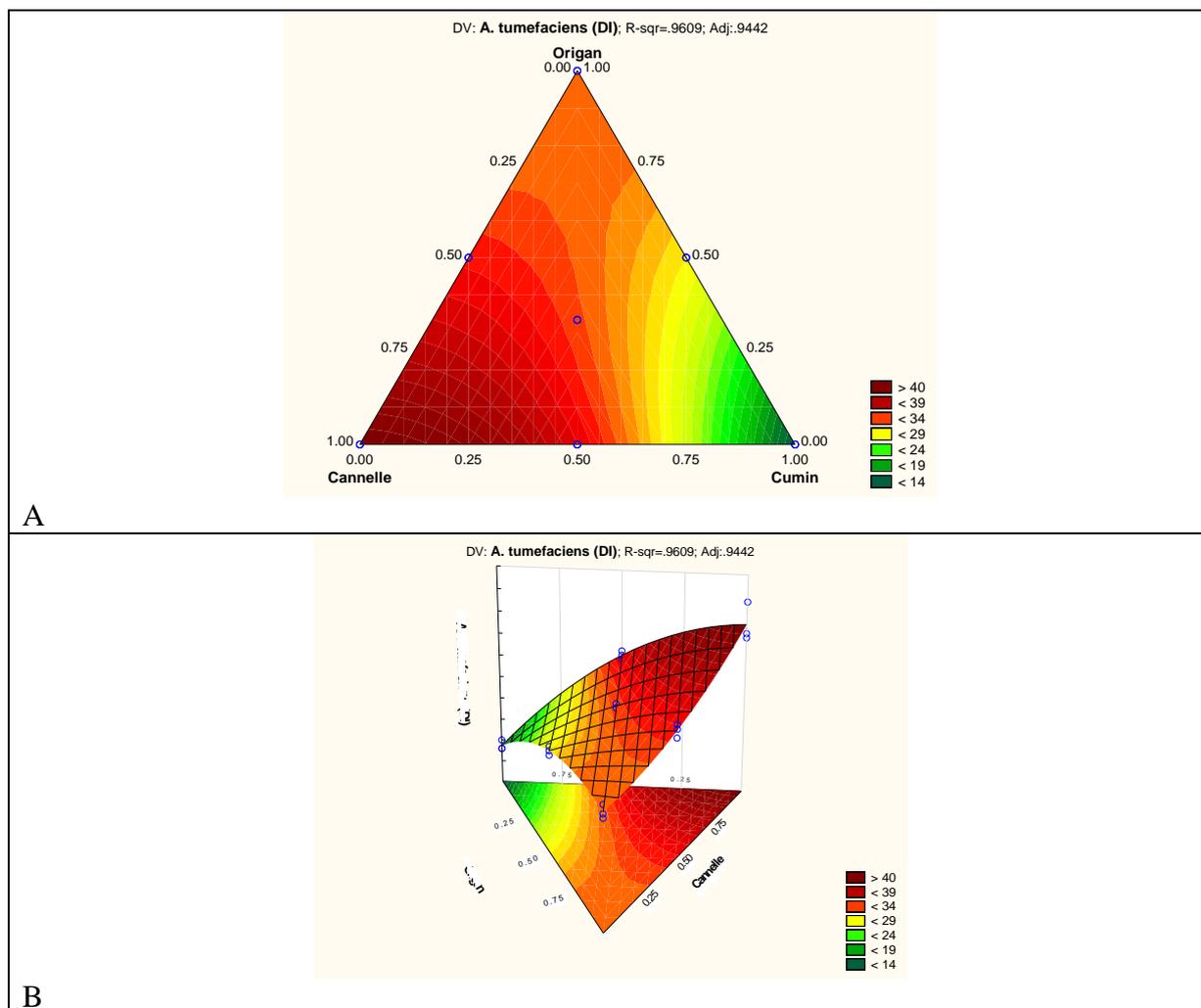
L'origan (B) représente positif l'effet le plus important sur le diamètre de la zone d'inhibition de *E. amylovora*, suivie par la cannelle (A), et enfin par le cumin. En ce qui concerne les effets des mélanges, l'interaction binaire de la cannelle et l'origan a présenté le plus grand effet positif, alors que l'interaction tertiaire avait un effet négatif sur le diamètre de la zone d'inhibition.



**Figure 8:** charte Pareto de l'effet antibactérien (diamètres de la zone d'inhibition) des trois huiles essentielles et leurs mélanges sur *E. amylovora*

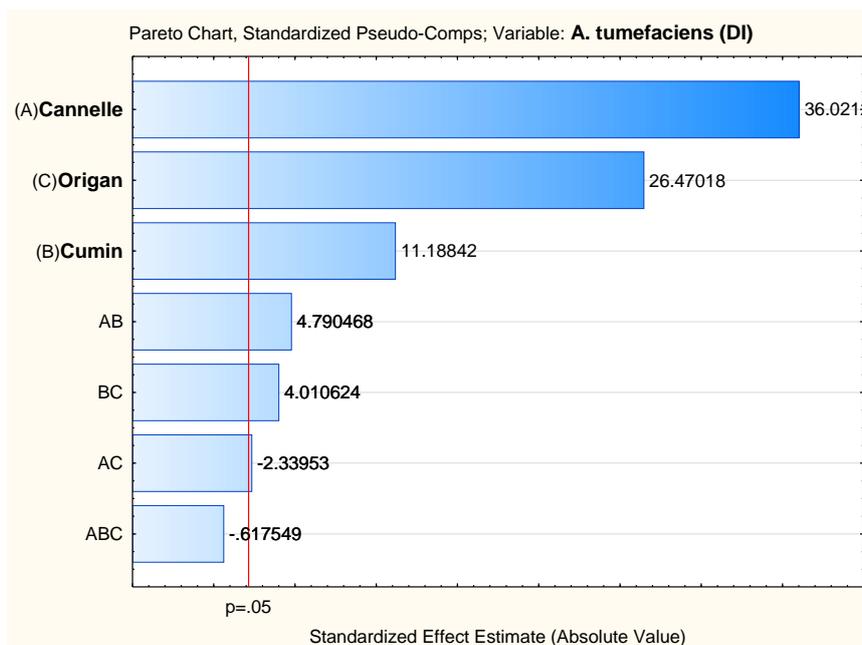
**b. Analyse de surface de l'activité antibactérienne contre *A. tumefaciens***

Le modèle quadratique décrivant la relation entre les variables de réponse et les facteurs ont été choisis pour évaluer l'effet des trois huiles essentielles et leurs mélanges sur le diamètre de la zone d'inhibition chez *A. tumefaciens*. Les surfaces de réponse obtenues par la conception des mélanges sont illustrées aux figures 9 (A et B). On observe que l'huile essentielle de la cannelle a démontré la plus forte activité antibactérienne contre *A. tumefaciens*, suivi par celle de l'origan.



**Figure 9 :** Surface de réponse de l'effet antibactérien (diamètres de la zone d'inhibition) des trois huiles essentielles et leurs mélanges sur *A. tumefaciens*

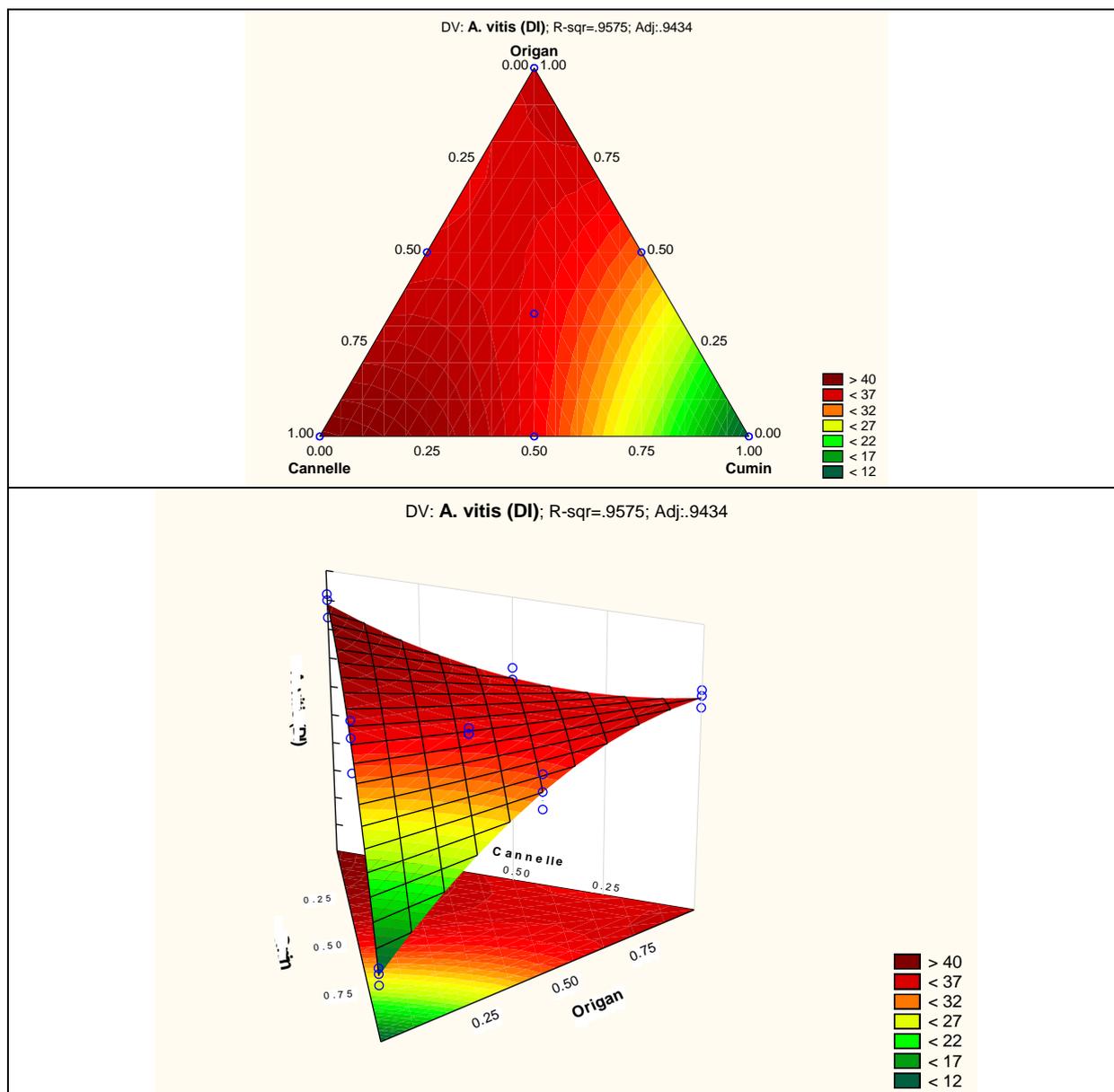
Selon la figure 10 la cannelle (A) représente positif l'effet le plus important sur le diamètre de la zone d'inhibition de *A. tumefaciens*, suivie par le l'origan (B) et puis le cumin (C). On constate aussi que l'interaction binaire (AB, AC, BC) entre les trois huiles essentielles avait un effet positif à l'exception de l'interaction tertiaire (ABC) qui a présenté un effet négatif.



**Figure 10 :** charte Pareto de l'effet antibactérien (diamètres de la zone d'inhibition) des trois huiles essentielles et leurs mélanges sur *A. Tumefaciens*

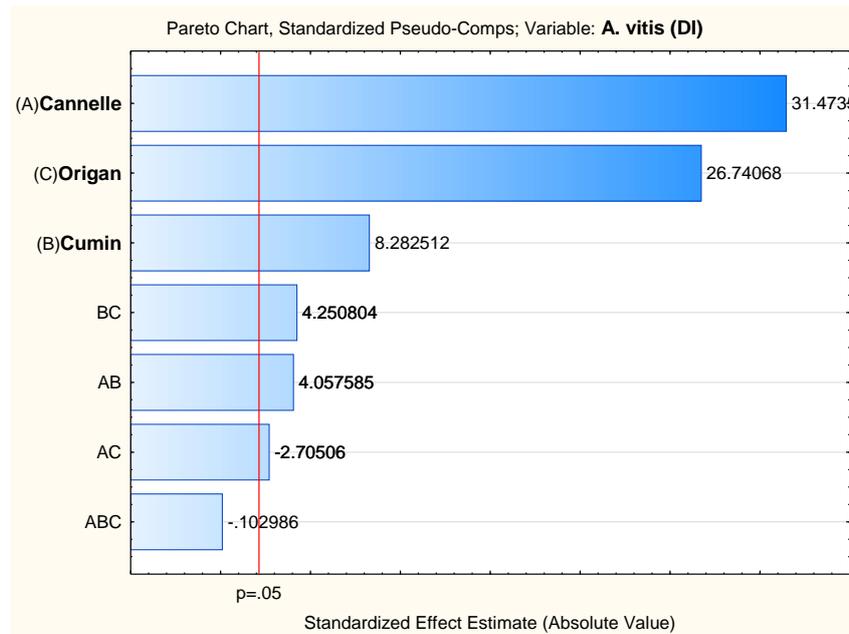
### c. Analyse de surface de l'activité antibactérienne contre *A. vitis*

Le modèle quadratique décrivant la relation entre les variables de réponse et les facteurs ont été choisis pour évaluer l'effet des trois huiles essentielles et leurs mélanges sur le diamètre de la zone d'inhibition chez *A. vitis*. La figure 11 indique que la concentration de l'huile essentielle de la cannelle et de l'origan a eu un effet linéaire positif et un effet quadratique positif sur le diamètre de la zone d'inhibition. L'ajout de deux huiles essentielles dans le mélange augment sa capacité antibactérienne contre *A. vitis*.

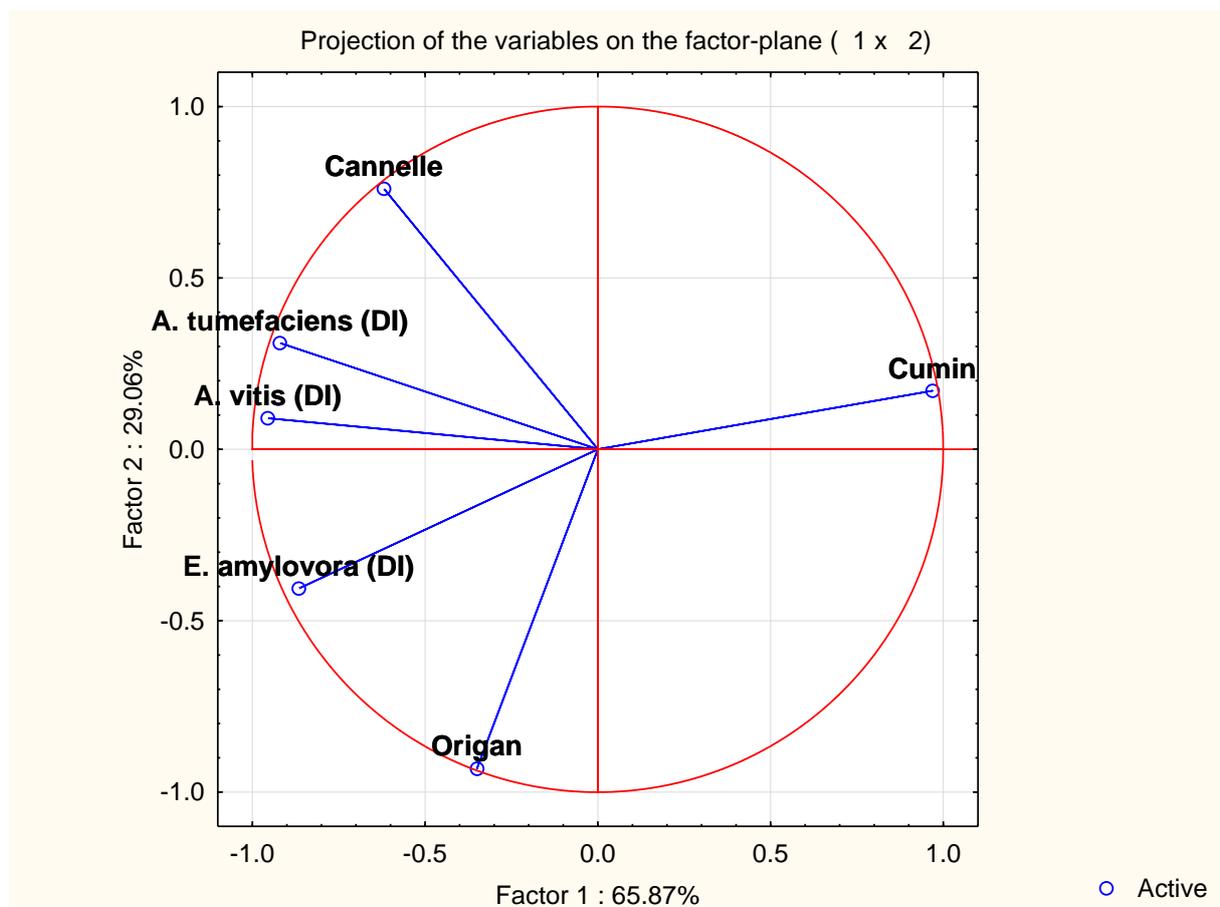


**Figure 11** : Surface de réponse de l'effet antibactérien (diamètres de la zone d'inhibition) des trois huiles essentielles et leurs mélanges sur *A. vitis*

Selon **la figure 12** la cannelle (A) représente positif l'effet le plus important sur le diamètre de la zone d'inhibition de *A. tumefaciens*, suivie par le l'origan (B) et puis la cumin (C). On constate aussi que les interaction binaire (AB, BC) des huiles essentielles avait un effet positif à l'exception de l'interaction binaire (AC) qui a présenté un effet négatif. Alors que de l'interaction tertiaire (ABC) n'avait pas d'effet significatif.



**Figure 12 :** Charte Pareto de l'effet antibactérien (diamètres de la zone d'inhibition) des trois huiles essentielles et leurs mélanges sur *A. vitis*



**Figure 13 :** analyse en composante principale pour le diamètre des zones d'inhibition des trois bactéries en fonction des trois huiles essentielles et leurs mélanges

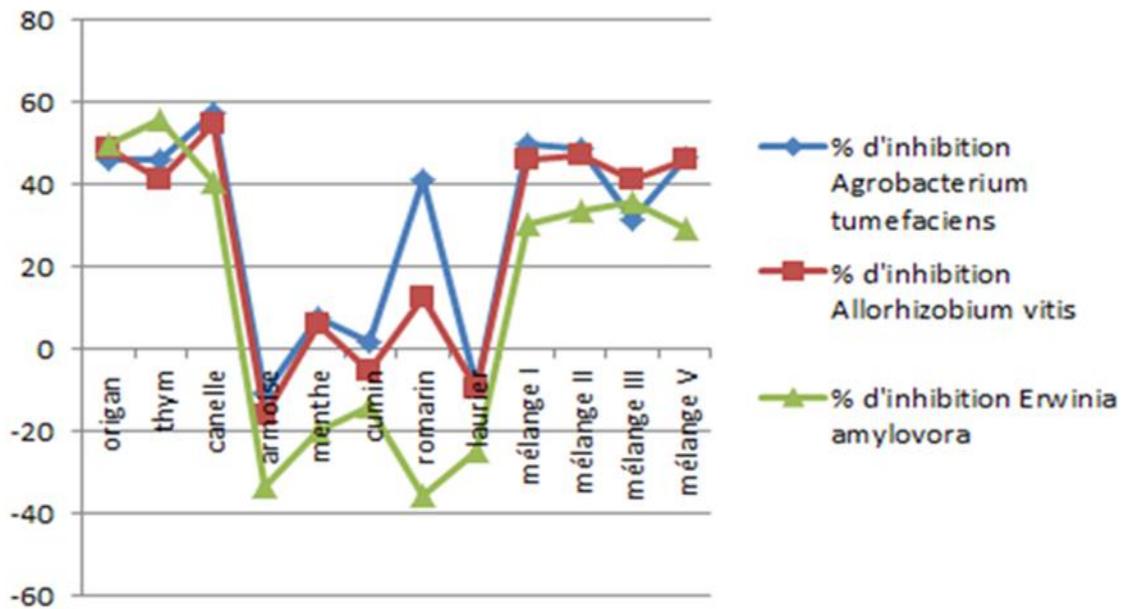
## 5. Indice d'efficacité antimicrobien

La comparaison des Zones d'Inhibition (ZI) des Huiles Essentielles (HE) avec celles des antibiotiques réputés être efficaces contre les trois bactéries qui ont fait l'objet de notre étude a permis d'établir les pourcentages d'inhibition des HE. Il en ressort que ce pourcentage d'inhibition dépend à la fois de la nature de l'HE donc de son activité antibactérienne intrinsèque mais également de la nature de la souche bactérienne contre laquelle l'HE est utilisée.

Ainsi concernant *A.tumefaciens* le diamètre d'inhibition de la rifampicine était de 12 mm pendant ce temps dans les mêmes conditions des HE telles que l'origan, le thym, la cannelle, le romarin ont montré une activité antibactérienne au moins quarante fois plus importante que la rifampicine notamment la cannelle qui a été environ cinquante-cinq fois plus active que la rifampicine. Parallèlement, d'autres HE ont montré une activité beaucoup plus modérée c'est le cas de du cumin et de la menthe qui sont respectivement une fois et sept fois plus active que la rifampicine sur *A.tumefaciens*. Par contre, il s'est avéré que des HE sont moins actifs que la rifampicine c'est le cas du laurier et de l'armoise qui sont environ dix fois moins actives que la rifampicine. Au niveau des associations celle qui retient le plus notre attention est le mélange III constitué de cannelle et d'origan ( $\frac{1}{2} - \frac{1}{2}$ ) avec un pourcentage d'inhibition à peine supérieur à 30% ce qui est largement inférieur à l'activité antibactérienne de ces HE utilisées séparément. Il pourrait donc y avoir des composés antagonistes entre ces HE ce qui a tendance à faire baisser leur pouvoir antibactérien.

Sur *A.vitis*, le diamètre d'inhibition de la rifampicine était de 11 mm tandis que celui de la streptomycine était de 13 mm. Certaines HE ont montré une activité antibactérienne plus élevée que ces deux antibiotiques c'est le cas notamment de la cannelle qui est environ cinquante-cinq fois plus active que ces deux antibiotiques sur *A.vitis*. Toutefois des HE se sont montrées moins efficaces que ces antibiotiques c'est le cas de l'armoise qui est seize fois moins active.

Le diamètre d'inhibition de la streptomycine sur *E.amylovora* était de 15 mm. Les HE qui ont montré une activité inhibitrice supérieure à cet antibiotique sont : l'origan, le thym, la cannelle, le romarin. Par contre celles qui ont montré une activité inhibitrice inférieure à la streptomycine sont le laurier, le cumin surtout l'armoise qui est seize fois moins efficace que cet antibiotique.



**Figure 14** : % d'inhibition des huiles essentielles seules et du mélange des trois phytopathogènes par apport aux antibiotiques.

#### 6. L'effet bactéricide et bactériostatique

Pour caractériser l'effet Bactériostatique ou Bactéricide des HE nous déterminons leur CMI et CMB puis on calcule le rapport CMB/CMI. Ainsi si:

$CMB/CMI < 2$  = HE bactéricide

$CMB/CMI > 32$  = souche tolérante

CMB très éloigné de la CMI = HE Bactériostatique

Pour *Erwinia amylovora* (**tableau 4**) toutes les HE ainsi que les 4 mélanges ont un effet bactéricide sauf le cumin et la menthe pouliot qui ont un effet bactériostatique.

Pour *Agrobacterium tumefaciens* (**tableau 5**) seul le Romarin à un effet bactériostatique les autres sont bactéricides. Et finalement, on trouve que chez *Allorhizobium vitis* toutes les huiles essentielles seules ou en mélange ont un effet bactéricide à l'exception des huiles du Cumin et du Romarin (**Tableau 6**).

**Tableau 4 :** Concentration minimale inhibitrice CMI et bactéricide CMB et leur rapport CMB/CMI pour *Erwinia amylovora*

Huiles Essentielles	<i>E.amylovora</i> CMI(ug/ml)	<i>E. amylovora</i> CMB (ug/ml)	<i>E.amylovora</i> CMB/CMI
Mélange I	3,09868 E -08	9,29605 E -08	1
Mélange II	8,3045 E -07	8,3045 E -07	1
Mélange III	2,33441E -06	2,10097 E -05	0.83
Mélange V	2,35777E -06	2,35777 E -06	1
Origan	6,19292 E -05	6,19292 E -05	1
Cannelle	0,073791504	0,147583008	2
Romarin	0,524088542	1,048177083	2
Cumin	0,014774171	0,398902606	26,99
Laurier	0,393781436	0,393781436	1
Menthe Pouliot	0,134202103	0,40260631	3

**Tableau 5 :** Concentration minimale inhibitrice CMI et bactéricide CMB et leur rapport CMB/CMI pour *Agrobacterium tumefaciens*

Huiles Essentielles	<i>A. Tumefaciens</i> CMI (ug/ml)	<i>A. Tumefaciens</i> CMB(ug/ml)	<i>A. Tumefaciens</i> CMB/CMI
Mélange I	9,29605E -08	9,29605E -08	1
Mélange II	3,08E -08	3,08E -08	1
Mélange III	8,65E -08	8,64598E -08	1
Mélange V	8 ,73E -08	8.7325E -08	1
Origan	3,10E-05	3,09646E -05	1
Cannelle	0,00028825	0 ,000288248	1
Romarin	8,385	16,77083333	2
Cumin	0 ,39890261	0,398902606	1
Laurier	0.04375349	0,043753493	1
Menthe Pouliot	1.20781893	1,20781893	1

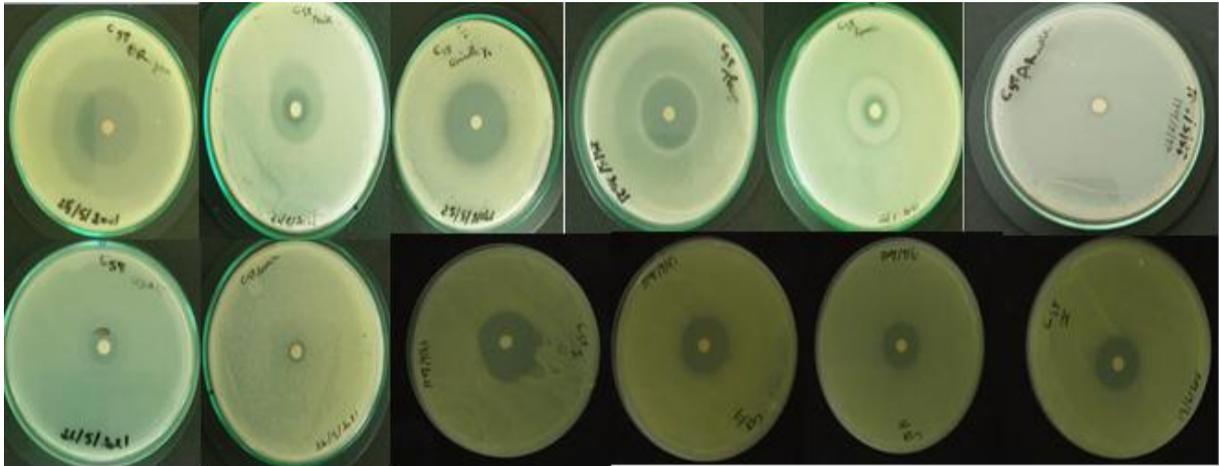
**Tableau 6 :** Concentration minimale inhibitrice CMI et bactéricide CMB et leur rapport CMB/CMI pour *Allorhizobium vitis*

Huiles Essentielles	<i>A. Vitis</i> CMI (ug/ml)	<i>A. Vitis</i> CMB (ug/ml)	<i>A. Vitis</i> CMB/CMI
Mélange I	9,29605E -08	2,7882 E -07	0,875
Mélange II	9 ,23E -08	9,23 E -08	1
Mélange III	2,33441 E-06	7,00324 E -06	1
Mélange V	7 ,85925E -07	7,07332E -06	0.857
Origan	3 ,09646 E -05	3,09646 E -05	1
Cannelle	0,000288248	0,000288248	1
Romarin	1,048177083	2,096354167	2
Cumin	0,132967535	1,196707819	9
Laurier	0,043753493	0,043753493	1
Menthe Pouliot	1,20781893	1,20781893	1

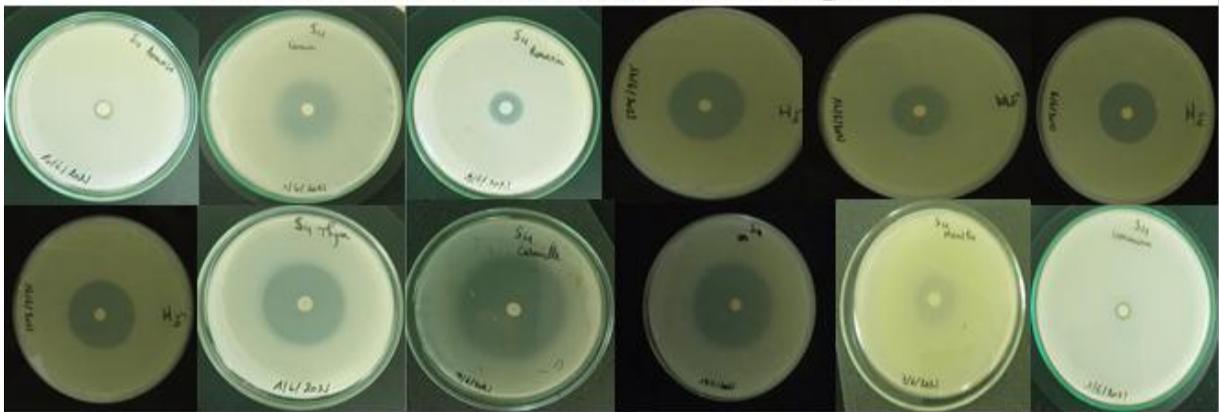
## Conclusion

Au terme de cette étude, nous retiendrons que les huiles essentielles représentent une alternative crédible à la lutte contre les phytopathogènes. Nous avons montré qu'une huile essentielle seule ou en association a la capacité d'exercer une activité antibactérienne sur des bactéries qui détruisent les cultures telles que *A. tumefaciens*, *A.vitis* et *E.amylovora*. Toutefois, ces huiles essentielles n'ont pas le même degré d'activité. En effet certaines comme l'origan, la cannelle et le thym se sont avérées plus efficaces contre ces phytopathogènes. D'autres par contre le laurier, la menthe pouliot ainsi que le cumin ont eu un effet moins important que des antibiotiques utilisés dans la lutte chimique contre ces bactéries. Fort de tout ce qui précède nous proposons une orientation vers les huiles essentielles à forte teneur en phénols terpénoïdiques (origan, thym) ainsi que la cannelle afin d'en faire des biopesticides. Pour ce faire, nous recommandons d'autres études permettant de dresser le profil chimique exhaustif de ces huiles seules ou en mélange, d'améliorer l'extraction de ces huiles essentielles afin de conserver les composés volatils qu'elles renferment et d'évaluer la cytotoxicité de ces huiles essentielles pour les cultures afin de déterminer la concentration optimale d'utilisation de ces huiles.

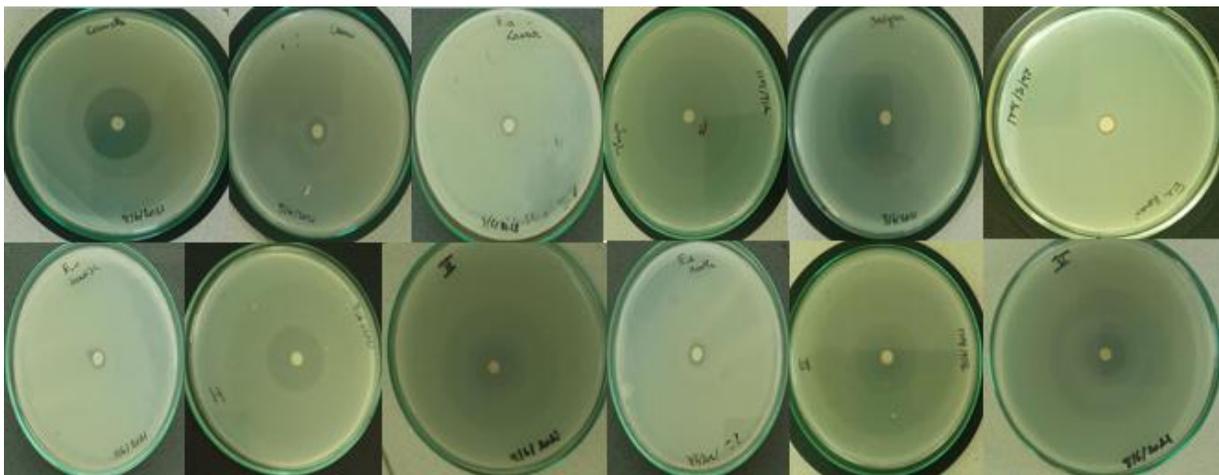
## Annexe 1



Les zones d'inhibition des HE seules et des mélanges sur C58



Les zones d'inhibition des HE seules et des mélanges sur s4

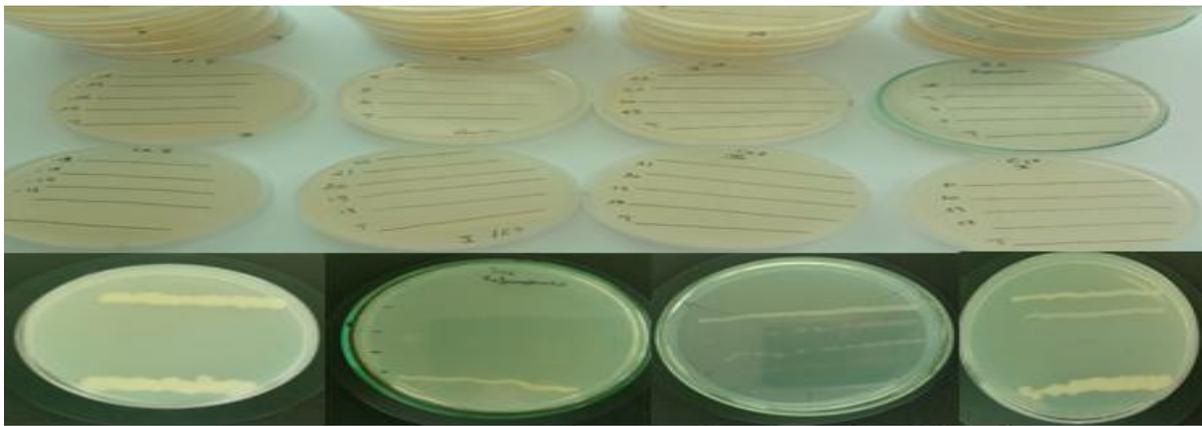


Les zones d'inhibition des huiles essentielles et des mélanges sur E.A

## Annexe 2



Les concentrations minimales inhibitrices



Les concentrations minimales bactéricides de différents bactéries



Les 8 huiles essentielles étudiées

Les deux antibiotiques

## Références

- [1]. **Hmamouchi M.** Les plantes médicinales et aromatiques marocaines. Editions Fedala, Mohammedia 1999.
- [2]. **Gazengel J-M., Orecchioni A-M.** Le préparateur en pharmacie. 2ème édition. Ed. Lavoisier, Paris, 2013.
- [3]. **Larousse médicale.** 3ème Ed Larousse, Boulogne, 2001.
- [4]. **Lorrain E.** 100 questions sur la phytothérapie. Ed. La boétie, Italie 2013.
- [5]. **Mikou M.** cours des plantes aromatiques et médicinales licence biotechnologie et valorisation des phytoressourcesfst Fès
- [6]. **Tardivon J. C. et Chadouli M. (2012).** Plantes aromatiques et médicinales. Tétouan-Maroc. Pp : 5-15.
- [7]. **Lardry J-M, Haberkorn V.** L'aromathérapie et les huiles essentielles. KinesitherRev 2007; 61 : 14-7.
- [8]. **Franchomme P., Pénéol D, Jollois R.** L'aromathérapie exactement- Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Fondements, démonstration, illustration et applications d'une science médicale naturelle. Editions Jollois, 1990,445p.
- [9]. **Abrassart JL.** Aromathérapie essentielle : huiles essentielles ; parfums pour le corps et l'âme. Editions Guy trédaniel 1997, 271p.
- [10]. **Roulier G.** Les huiles essentielles pour votre santé : traité pratique d'aromathérapie. Propriétés et indications thérapeutiques des essences de plantes. Editions Dangles,1990.
- [11]. **Nogaret-Ehrhart A-S.** La phytothérapie : se soigner par les plantes. Ed. Eyrolles, Paris 2008.
- [12]. **Pharmacopée européenne.** Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles. Agence Française de Sécurité Sanitaire des produits de santé (Afssaps) Mai 2008.
- [13]. **MOHAMMEDI Z. -2006-** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelque plantes de la région de Telemcen .Th. Mag. Biologie. Univ. Telemcen.
- [14]. **BRUNETON ,1993 / ZABEIROU et HACHIMOU ,2005 . , khellaf, Nour el houda** effet des propriétés physicochimique et du pouvoir antibactérien de l'huile essentielle de Zingiber officinale « Formes Fraiche et séchée »
- [15]. **Couic-Marinier F., Lobstein A.** Les huiles essentielles gagnent du terrain à l'officine. Actualités pharmaceutiques 2013; 52 (525) : 18-21.
- [16]. **Bego GV.** Connaître l'essentiel sur les huiles essentielles. Ed. MDB 2003.
- [17]. **Herzi N. (2013).** Extraction et purification de substances naturelles : Comparaison de l'extraction au CO<sub>2</sub>-supercritique et des techniques conventionnelles. Rapport de thèse du doctorat, (thèse de doctorat) Univ. De Toulouse. 193p.

- [18]. **RHAYOUR K.**, Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, **2002**. 170p
- [19]. **Pinchuk I., Shoval H., Dotan Y., Lichtenberg D., (2012)**. Evaluation of antioxidants: Scope, limitations and relevance of assays. *Chemistry and Physics of Lipids*, 165: 638– 647.
- [20]. **Chaker E.K., (2010)**. Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées. (Thèse de Doctorat université de Toulouse), 70-71.
- [21]. **Scimeca D., (2007)**. Les plantes du bonheur, Alpen, 12-17.
- [22]. **Festy D., (2011)**. Les huiles essentielles ça marche ! Avec 78 formules à commander en pharmacie, LEDUC.S Edition, 22-26, ISBN: 978-2- 84899-316-4
- [23] **Siddiqui Y.M., Ettayebi M., Haddad A.M & Al-Ahdal M.N.**- Effect of essential oils on the enveloped viruses : antiviral activity of oregano and clove oils on herpes simplex virus type 1 and Newcastle disease virus. *Med. Sci.Res.* 1996, 24 : 185-186.
- [24]. **Beylier-Maurel M.F;** -Activité bactériostatique des matières premières de parfumerie. *Rivista Italiana. E.P.P.O.S.*, 1976, 58: 283-286.
- [25]. **Tohidpour A., Sattari M., Omidbaigi R., Yadegar A., Nazemi J., (2010)**. Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Phytomedicine*. 17, 142–145.
- [26]. **Kimizibekmek H., Demirci B., Yeşilada E., Başer K. H. C., Demirci F., (2009)**. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* growing wild in Turkey. *Natural Product Communications*, 4, 1001–1006.
- [27]. **Ultée A., Gorris L.M.G & Smid E.J.**- Bactericidal activity of carvacrol towards the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *J. Appl. Microbiol.* 1998, 85: 211-218.
- [28]. **Ultée A., Slump R.A., Steging G. & Smid E.J.** –Antimicrobial activity of Carvacrol towards *Bacillus cereus* on rice. *J. Food Prot.* 2000, 63(5): 620-624.
- [29]. **Didry N., Dubreuil L. & Pinkas M.** – Antibacterial activity of thymol, carvacrol and cinnamaldehyde alone or in combination. *Pharmazie* 1993, 48(4) : 301-304.
- [30]. **Juven B.J., Kanner J., Schved F., and Weisslowicz H.** -Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *J. Appl. Bacteriol.* 1994.76: 626-631.
- [31]. **Kachadourian, R., Dellagi, A., Laurent, J., Bricard, L., Kunesch, G., Expert, D. (1996)**. Desferrioxamine-dependent iron transport in *Erwinia amylovora* CFBP1430 :cloning of the gene encoding the ferrioxamine receptor FoxR, *BioMetals*, vol.9, p 143-150.
- [32]. **Block, A., Li, G.Y., Fu, Z.O., Alfano, J.R. (2008)**. Phytopathogen type III effector weaponry and their plant targets. *Curr Opin Plant Biol*, vol.11, p 396-403.

[33]. **BRAUN AC.** Thermal studies on the factors responsible for tumor initiation in crown gall. *Am J Bot.* 1947 Apr; 34(4):234-40. PMID: 20249520.

[34]. **Achbani, Habbadi, (2017).** La Lutte Biologique contre. Allorhizobiumvitis [consulté le 5 Mai 2021] <http://inrameknes.info/wp-content/uploads/2017/05/Article-Achbani.pdf>