

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique Université Ibn Khaldoun –Tiaret–
Faculté Sciences de la Nature et de la Vie
Département Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Infectiologie

Présenté par :

M^{lle} Adda Nadjat

M^{lle} Bouguessa Maroua

M^{lle} Chachoua Nesrine

Thème

**Evaluation de l'Activité Antibactérienne de Quelques Huiles
Essentielles vis-à-vis de Quelques Souches Pathogènes**

Soutenu publiquement le : 30/06/2022

Jury:	Grade
Président: Dr. BOUMEZRAG Assia	MCA
Examineur: Dr. MERATI Rachid	MCA
Encadrant: Dr. BENBELKACEM Idir	MCB

Année universitaire 2021-2022

REMERCIEMENTS

Nous remercions avant tout Dieu le tout-puissant qui nous a aidé à être ce qui nous sommes aujourd'hui.

*Nous commençons par exprimer nos profondes reconnaissances et nos vifs remerciements à **Dr. Benbelkacem Idir** qui nous a honorés en acceptant de diriger ce travail, pour ses encouragements, ses conseils, sa disponibilité et surtout pour sa patience dans la correction de ce mémoire. Nous avons été satisfait de votre qualité exceptionnelle de bonne enseignante, merci de nous guider patiemment ; Nous ne pouvons que vous exprimer notre sincère respect et notre gratitude.*

*Nous tenons à remercier les membres du jury **Dr. Boumezrag Assia** c'est un grand honneur vous accepter pour présider le jury de ce mémoire et **Dr. Merati Rachid** d'avoir accepté d'examiner ce travail, qu'il trouve ici toutes nos expressions respectueuses.*

*Nos remerciements plus particulièrement à chef de spécialité **Pr. Doukani Koula**.*

*Nos sentiments de reconnaissance et Nos remerciements vont aussi à **Mlle. Soualmi Kheira** du laboratoire de Microbiologie, et à **M. Bouteffal Abd el Hamid** du laboratoire de Biochimie pour avoir mis à notre disposition le matériel demandé.*

Ainsi que toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin dans l'aboutissement de ce travail.

DEDICACES

Tout au début, nous tenons à remercier le bon DIEU de nous avoir donné du courage et de la patience afin de réaliser ce mémoire qui nous dédions :

A mes parents, pour leur soutien infaillible tout au long de ces années A toutes nos familles paternelles et maternelles.

A mon frère Abdesalam et sœurs Khadidja, Thouraia et Karima, je vous souhaite beaucoup de réussite dans votre vie. Que dieu vos garde et illumine vos chemins.

*A mes chères amies et binôme Maroua et Nesrine,
merci aux bons moments qu'ont partagé afin de donner naissance à ce projet.*

A mes meilleures amies : Khaldia Hanane Sara Raihana,

Merci pour les bons moments qu'on a partagé ensemble, je vous aime tous.

...Nadjat

DEDICACES

DIEU merci,

Je dédie ce modeste travail à mon cher papa et ma chère maman pour leur aide et leur soutien tout au long de mes études.

A mes chères sœurs Fatima, Amina, Khadija, Soulef, Razika.

A mes frères Mohamed, Madjid.

A ma grand-mère Mbarka a la mémoire que j'aime beaucoup, la personne la plus douce que j'aie jamais vue

A mes binômes et sœur et amie Nadjat, Nesrine.

A mes camarades avec lesquelles j'ai partagé mes meilleurs moments : Khaldia, Hanane, Sara.

...Maroua

DEDICACES

Tout d'abord, je tiens à remercier DIEU

Je dédie ce modeste travail à mon cher papa et ma chère maman pour leur aide et leur soutien tout au long de mes études.

A mes chères sœurs Latifa, Maroua, Ines, Serine A mon frère Mohamed.

A ma grand-mère Zineb que j'aime beaucoup, la personne la plus douce que j'aie jamais vue

A toutes nos familles paternelles et maternelles.

A mes binômes, sœurs et amies : Nadjat et Maroua.

A mes camarades avec lesquelles j'ai partagé mes meilleurs moments : Khaldia, Hanane, Sara.

...Nesrine

TABLE DES MATIERES

Liste des Abréviations.....	i
Liste des figures.....	ii
Liste des Tableaux.....	iii
Liste des annexes.....	iv
Introduction.....	1

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Généralités sur les huiles essentielles

I.1. Définition.....	6
I.2. Historique.....	6
I.3. Propriétés physiques et chimiques.....	7
I.3.1. Propriétés physiques.....	7
I.3.2. Composition chimique.....	7
I.3.2.1. Terpènes.....	7
I.3.2.2. Composés aromatique.....	7
I.3.2.3. Composés d'origine variée.....	7
I.4. Méthode d'extraction des huiles essentielles.....	8
I.4.1. Distillation ou Entraînement à la vapeur.....	8
I.4.2. Hydrodistillation.....	8
I.4.3. Enfleurage.....	9
I.4.4. Extraction par solvants chimique.....	9
I.4.5. Extraction au CO ₂ supercritique.....	10
I.5. Activité des huiles essentielles.....	10
I.5.1. Activité antibactérienne.....	10
I.5.2. Activité antifongique.....	10

I.5.3. Activités antiseptique.....	11
I.6. Toxicité des huiles essentielles.....	11
I.7. Association des huiles essentielles.....	12

Chapitre II : Généralités sur *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*

II.1. <i>Escherichia Coli</i>	14
II.1.1. Définition.....	14
II.1.2. Taxonomie.....	14
II.1.3. Habitat.....	15
II.1.4. Morphologie.....	15
II.1.5. Pathogénicité.....	16
II.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	16
II.2.1. Définition.....	16
II.2.2. Taxonomie.....	17
II.2.3. Habitat.....	17
II.2.4. Morphologie.....	17
II.2.5. Pathogénicité.....	18

Chapitre III : Généralités sur les plantes utilisées

III.1. <i>Eucalyptus globulus</i>	21
III.1.1. Historique.....	21
III.1.2. Description.....	22
III.1.3. Composition chimique d' <i>Eucalyptus globulus</i>	22
III.1.4. Propriétés.....	23
III.2. <i>Mentha Spicata</i> (menthe verte).....	23
III.2.1. Historique.....	23
III.2.2. Description.....	25
III.2.3. Composition biochimique de <i>Mentha spicata</i>	26

III.2.4. Propriétés	26
III.3. Origan	27
III.3.1. Historique	27
III.3.2. Description.....	27
III.3.3. Composition chimique de l'origan	28
III.3.4. Propriété.....	28

Deuxième Partie

Partie Expérimentale

Chapitre IV : Matériel et Méthodes

IV.1. Objectif du travail	32
IV.2. Lieu et période de travail	32
IV.3. Matériel.....	32
IV.3.1. Matériel végétal.....	32
IV.3.2. Matériel biologique.....	33
IV.3.3. Matériel du laboratoire	33
IV.4. Méthodes	35
IV.4.1. Protocole expérimental	35
IV.4.2. Extraction des huiles essentielles	36
IV.4.3. Confirmation des souches.....	37
IV.4.4. Evaluation de l'activité antibactérienne.....	40
Méthode de diffusion sur disque ou aromatoigramme	40
Détermination de concentration minimale inhibitrice	41
Détermination de la concertation inhibitrice fractionnaire	43

Chapitre V : Résultats et Discussion

V.1. Aromatoigramme	47
---------------------------	----

V.2. Concentration Minimale Inhibitrice (CMI).....	50
V.2.1. Concentration minimale inhibitrice de l'origan	51
V.2.2. Concentration minimale inhibitrice de <i>Mentha spicata</i>	53
V.2.3. Concentration minimale inhibitrice d' <i>Eucalyptus globulus</i>	53
V.2.4. Détermination de la CIF et de l'indice CFI (ICFI)	54
Conclusion	57
Références Bibliographiques	58
ANNEXES	67
Résumé	70

Liste des abréviations

ATCC : American type culture collection

CMI : Concentration minimale inhibitrice

ECAD : *Escherichia coli* à adhésion diffuse

ECD : *Escherichia coli* diarrhéique

ECEA : *Escherichia coli* entéroaggrégatif

ECEI : *Escherichia coli* entéroinvasif

ECEP : *Escherichia coli* entéropathogène

EETC : *Escherichia coli* entérotoxigène

ECExP : *Escherichia coli* pathogène extra-intestinal

Gram- : gram négatif

Gram+ : gram positif

HE : Huile essentielle

ECST : *Escherichia coli* shiga toxine productrice.

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Principe schématisé de l'hydrodistillation	9
Figure 2: Feuilles d' <i>Eucalyptus globulus</i>	22
Figure 3: Menthe verte (<i>Mentha spicata</i>).....	26
Figure 4: <i>Origanum</i> sp.....	28
Figure 5: Schéma général du protocole expérimental	35
Figure 6 : Dispositif d'hydrodistillation	37
Figure 7 : Technique d'ensemencement.....	38
Figure 8: Microscopie optique de <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Escherichia coli</i>	38
Figure 9: Test de catalase	39
Figure 10: Test d'oxydase.....	39
Figure 11 : Plaque de microtitration (Détermination de la CMI)	42
Figure 12: Méthode de détermination de la CIF	43
Figure 13: Résultats de l'aromatogramme	46
Figure 14 : Diamètres des zones d'inhibitions de la souche <i>E. coli</i> de l'HE de l'origan.....	47
Figure 15 : Diamètres des zones d'inhibitions de la souche <i>S.aureus</i> de l'HE de l'origan	47
Figure 16 : Diamètres des zones d'inhibitions de la souche <i>E. coli</i> de l'HE de l'eucalyptus..	48
Figure 17 : Diamètres des zones d'inhibitions de la souche <i>S.aureus</i> de l'HE de l'eucalyptus...	48
Figure 18 : Diamètres des zones d'inhibitions de la souche <i>E. coli</i> de l'HE de menthe.....	49
Figure19 : Diamètres des zones d'inhibitions de la souche <i>S.aureus</i> de l'HE de menthe	49
Figure 20: Détermination de la CFI et de l'ICFI	52

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Taxonomie d' <i>Escherichia coli</i>	14
Tableau 2: Taxonomie de <i>Staphylococcus aureus</i>	17
Tableau 3: Matériel de laboratoire et produits utilisés	34
Tableau 4: Résultats de la CMI	48

LISTES DES ANNEXES

Annexes 1 Les milieux des cultures.....	67
Annexes 2 les huiles essentielles.....	68
Annexes 3 les résultats de CMI.....	68

Introduction

Générale

L'émergence des microorganismes pathogènes multi-résistants pose actuellement un problème de santé publique particulièrement préoccupant. En effet, la résistance des germes aux antibiotiques rend quelques fois le traitement thérapeutique inefficace et impose la recherche de nouveaux agents antimicrobiens. Le recours aux plantes médicinales constitue alors une des plus intéressantes pistes à explorer **(Benkherara, 2011)**.

De nos jours, la tendance de l'utilisation des produits naturels issus des plantes est en pleine croissance face au souci des effets secondaires des composés synthétiques qui peuvent être nocifs à la santé humaine et à l'environnement. De ce fait, la réflexion s'est développée auprès des industriels visant à diminuer leurs utilisations **(Mnayer, 2014)**.

Les huiles essentielles suscitent de plus en plus l'intérêt des chimistes, biologistes et médecins en raison de leur richesse en composés terpéniques actifs qui représentent un large éventail d'application thérapeutique et industriel aussi varié que le domaine de la chimie, l'agroalimentaire, la cosmétique, l'électronique, le plastique et la pharmacie **(Bensalha, 2020)**.

La majorité des huiles essentielles sont obtenues par entraînement à la vapeur ou hydro distillation et elles possèdent d'importantes propriétés biologiques : antibactérienne, anti-inflammatoires, antioxydante, insecticides, etc., **(Seringe et al, 2021)**.

Staphylococcus aureus est le germe plus connu et est fréquemment impliqué dans l'étiologie d'infections et de toxi-infection variées chez l'homme. D'autres espèces de Staphylocoques peuvent cependant causer des infections opportunistes. Ces infections, souvent nosocomiales, engagent parfois le pronostic vital et requièrent un traitement adapté **(Benbouabdellah et Ziane, 2015)**.

Escherichia coli est l'un des agents pathogènes les plus opportunistes provoquant des maladies intestinales ou extra-intestinales tant chez l'homme que chez l'animal. Il a été rapporté que l'immunité naturelle contre les bactéries gram-négatives est souvent fournie par des anticorps qui reconnaissent les antigènes lipopolysaccharidiques(LPS), une molécule glycolipidique présente sur le feuillet externe de la membrane externe de la bactérie. Une telle reconnaissance

implique une partie de la structure du polysaccharide et ces sous-structures peuvent fournir finalement un outil pour étudier les relations structure-fonction (**Tapes et Sumanta ,1994**).

C'est dans cette optique que se situe ce projet de mémoire dont l'objectif principal est d'étudier l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de l'*Eucalyptus globulus*, de la menthe verte (*Mentha spicata*) et de l'origan (*Origanum* sp.) vis-à-vis d'une bactérie Gram négative (*Escherichia coli*) et d'une autre bactérie Gram positive (*Staphylococcus aureus*).

Dans ce contexte, nous avons réalisé une étude expérimentale composée de deux parties. L'objectif de la première partie était d'extraire les huiles essentielles de l'*Eucalyptus globulus*, de la menthe verte (*Mentha spicata* L.) et de l'origan. La deuxième partie du travail avait comme objectifs, dans un premier temps, de tester l'effet des huiles essentielles vis-à-vis des souches bactériennes de *Staphylococcus aureus* et d'*Escherichia coli* ; et dans un deuxième temps, de tester l'effet de l'association de 2 de ces huiles essentielles.

Première Partie

Synthèse

Bibliographique

Chapitre I

Généralités sur

Les huiles essentielles

L'utilisation des huiles essentielles en tant qu'ingrédients fonctionnels dans les aliments, les boissons, les produits de toilette et les cosmétiques, pour les consommateurs en croissance intérêt pour les ingrédients provenant de la nature source et aussi en raison de l'inquiétude croissante avec les additifs synthétiques nocifs.

En raison de leurs composants bioactifs, les huiles essentielle sont en effet prometteuses au regarde de leur comme agents antibactériens, antifongique et antioxydants efficaces avec l'intérêt croissant de la utilisation d'huile essentielles dans les aliments et les produits pharmaceutiques. Un examen systématique des extraits de plantes est devenu de plus en plus important (**Biljana Damjanović et al, 2011**).

I.1. Définition

Une huile essentielle est la fraction odorante volatile extraite des végétaux. C'est le parfum concrétisé de la plante un véritable concentré (**Danièle, 2014**). Elle peut être obtenue de différentes parties d'un végétale les feuilles, les graines, les bourgeons, les fleurs de brindilles, les écorces, les bois, les racines, les tiges ou les fruits (**Toure, 2015**).

Les huiles essentielles sont devenues l'intérêt des chimistes, biologistes et des médecins... etc. grâce à leur utilisation dans le traitement de quelques maladies infectieuses (**Ouis, 2015**).

I.2. Historique

L'utilisation des huiles essentielles remonte à l'Antiquité. Les Égyptiens les utilisaient sous forme de bains aromatiques. Les pharaons les utilisaient pour embaumer les corps des défunts. Les Romains et les Grecs ont aussi eu recours aux huiles essentielles pour leurs bains. À Athènes, au Vème siècle avant JC, lors de la grande épidémie de peste, Hippocrate utilisât des jarres où brûlaient des fumigations aromatiques afin d'enrayer l'épidémie (**Sallé, Jean- Luc, 1991**).

I.3. Propriétés physiques et chimiques

I.3.1. Propriétés physiques

Liquides à température ambiante, les huiles essentielles sont volatiles ce qui les différencie des huiles dites « fixes ». Elles ne sont que très rarement colorées. Leur densité est généralement inférieure à celle de l'eau à laquelle elles sont généralement peu miscibles voire non miscibles. Liposolubles, elles sont en revanche solubles dans les solvants organiques usuels (Cohen, 2013).

I.3.2. Composition chimique

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes et éminemment variables de constituants qui appartiennent, de façon quasi exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : les groupes des terpénoïdes d'une part et celui des composés aromatiques dérivés du phénylpropane, beaucoup moins fréquents, d'autre part. Elles peuvent également renfermer divers produits issus de processus de dégradation mettant en jeu des constituants non volatils (Bruneton, 2009).

I.3.2.1. Terpènes

Ce sont des molécules constituées d'un assemblage de plusieurs molécules d'isoprène (C₅H₈). Leur structure générale est sous forme (C₅H₈)_n. Ce sont les molécules les plus présentes dans le monde des huiles essentielles (Koziol, 2015).

I.3.2.2. Composés aromatique

Beaucoup moins fréquents que les terpénoïdes, ce sont des dérivées du phénylpropane (C₆-C₃) ou en C₆-C₁ (vaniline). Certaines huiles essentielles comportent également des lactones dérivées des acides cinnamiques (les coumarines) (Cohen, 2013).

I.3.2.3. Composés d'origine variée

En général, les composés d'origine variée de faible masse moléculaire, entraînés lors de l'hydrodistillation, sont des hydrocarbures aliphatiques à chaîne linéaire ou ramifiée porteurs de différentes fonctions. A titre indicatif, on peut citer :

- ✓ L'heptane et la paraffine dans l'essence de camomille.
- ✓ Des acides en C3 et C10.
- ✓ Des esters acycliques présents surtout dans les fruits : acétate de butyle (pomme) (Espace_réservé1), acétate d'isoamyle (banane).
- ✓ Des aldéhydes comme l'octanal et le décanal des citrus.
- ✓ Des alcools comme le 1-octèn-3-ol de l'essence de lavande (**Ouis ,2015**).

I.4. Méthode d'extraction des huiles essentielles

I.4.1. Distillation ou Entraînement à la vapeur

L'entraînement à la vapeur d'eau est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles. A la différence de l'Hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter. De la vapeur d'eau fournie par une chaudière traverse la matière végétale située au-dessus d'une grille. Durant le passage de la vapeur à travers le matériel, les cellules éclatent et libèrent l'huile essentielle qui est vaporisée sous l'action de la chaleur pour former un mélange « eau + huile essentielle ». Le mélange est ensuite véhiculé vers le condenseur et l'essencier avant d'être séparé en une phase aqueuse et une phase organique : l'huile essentielle. L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile (**Meyer, 1984**).

I.4.2. Hydrodistillation

Ce mode d'Extraction a été proposé par Garnier en 1891 (**Bruneton, 1993**). Lorsqu'on utilise cette technique, on fait chauffer un ballon contenant de l'eau ainsi que l'espèce végétale dont on veut récupérer l'huile jusqu'à ébullition.

Sous l'effet de la chaleur, les cellules végétales éclatent et libèrent leurs huiles, puis les vapeurs d'eau et d'huile vont s'élever pour atteindre un réfrigérant constitué de deux tubes : le premier dans lequel passe la vapeur pour se liquéfier et le second qui l'entoure et qui dispose d'une entrée

et d'une sortie à travers lequel on fait circuler de l'eau à température ambiante en continu pour refroidir.

On a alors plus qu'à récupérer le distillat dans un récipient tel une burette ou une éprouvette. On obtient deux phases puisque l'eau et l'huile ne sont pas miscibles. L'huile essentielle apparaît alors sur le dessus car elle est moins dense que l'eau (densité de 0,89 pour l'huile essentielle de lavande contre 1 pour l'eau). On peut alors évacuer l'eau si on a choisi d'utiliser une burette (**Chloé *et al*, 2014**).



Figure 1: Principe schématisé de l'hydrodistillation

I.4.3. Enfleurage

L'enfleurage est une méthode d'extraction manuelle des essences, complexe et très coûteuse, qui n'est plus tellement pratiquée de nos jours (**Buronzio, 2009**). Elle consiste à déposer des plantes en particulier les organes fragiles (fleurs d'oranger, pétales de rose) sur une couche de graisse animal qui se saturé en essence (**Lakhdar, 2015**).

I.4.4. Extraction par solvants chimique

Cette méthode est pratiquée au niveau industriel et utilise des produits chimiques comme le benzène, un solvant volatil. L'huile essentielle ainsi obtenue peut garder des traces du solvant utilisé dans l'opération (2 ou 3%).

I.4.5. Extraction au CO2 supercritique

Il s'agit d'une technique moderne, très coûteuse : du dioxyde de carbone à haute pression est employée pour faire exploser les poches végétales contenant l'essence, qu'il est alors possible de récupérer (**Buronzo, 2009**).

I.5. Activité des huiles essentielles

Véritables concentrés de principes actifs, les huiles essentielles Permettent, en thérapie, des actions multiples et rapides Elles sont toutes antiseptiques, désintoxicantes, revitalisantes et électives (appliquée sur un endroit du corps, une huile essentielle est attirée par l'organe ou la fonction du corps le plus déficient à un moment donné). De plus, elles ont chacune des propriétés spécifiques. Les mélanges d'huiles essentielles en synergie augmentent les bienfaits des huiles essentielles par rapport à Une indication précise (**Grosjean, 2015**).

I.5.1. Activité antibactérienne

L'action des huiles essentielles s'exerce sur un large spectre de bactéries, incluant les bactéries à Gram positive et les bactéries à Gram négative. La structure de la paroi cellulaire des bactéries à Gram positive les rend toutefois plus sensibles à l'action des huiles essentielles (**Raut et Karuppayil, 2014**). La structure de la paroi cellulaire des bactéries Gram négative les rend moins sensibles à l'action des huiles essentielles. La présence d'une membrane plasmique hydrophile externe chez les Gram négative empêche la pénétration intracellulaire des molécules hydrophobes composant la majorité des huiles essentielles. Cette caractéristique confère aux bactéries négatives une résistance à l'huile et même aux antibiotiques (**Lewis et Ausubel, 2006**).

Les huiles essentielles ont une double action contre les microbes : elles peuvent les tuer (effet bactéricide) et elles en arrêtent la prolifération (effet bactériostatique) Les plus puissantes pour cela sont celles qui contiennent des phénols(le thymol, par exemple), lesquels sont utiles pour lutter contre les infections bactériennes, virale et parasitaires (**Buronzo, 2009**).

I.5.2. Activité antifongique

Les infections fongiques sont d'une actualité criante aujourd'hui. En effet, leur extension est

largement favorisée par l'utilisation abusive et parfois trop légère des antibiotiques.

Ici les groupes moléculaires cités en priorité pour leurs actions antibactériennes se révèlent également actifs sur les champignons. Néanmoins, la durée d'un tel traitement sera plus longue que pour celle d'un traitement antibactérien.

Par exemple, les huiles essentielles de Cannelle, de palmarosa, de clou de girofle et de Niaouli sont des antifongiques.

I.5.3. Activités antiseptique

Les molécules aromatiques sont capables de détruire les germes infectieux, et de s'opposer à leur prolifération tant dans les organismes vivants que dans l'environnement. Dans ce dernier cadre, outre les aldéhydes cités plus haut Particulièrement actifs sur les bactéries sporulées, les terpènes sont réputés pour leurs propriétés désinfectantes atmosphériques.

En ce qui concerne la désinfection des locaux recevant des malades, en particulier les Salles de réanimation et les chambres de malades contagieux, on peut faire appel aux Huiles essentielles phénolées sous forme d'aérosols.

Les alcools associés au cinéole, comme c'est le cas dans l'huile essentielle D'Eucalyptus radié (*Eucalyptus radiata ssp. Radiata*), sont intéressants en période Hivernale pour l'assainissement de l'air des habitations (Pierron, 2014).

I.6. Toxicité des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des substances puissantes et très actives. Elles représentent une source inépuisable de remèdes naturels. Néanmoins, il est important de souligner que l'automédication fréquente et abusive surtout en ce qui concerne le dosage ainsi que le mode d'application interne ou externe par les essences est nocive. Elle engendre des effets secondaires plus ou moins néfastes dans l'organisme (allergies, coma, épilepsie,...) principalement chez les populations sensibles (enfants, femmes enceintes et allaitants, personnes âgées ou allergiques) (Degryse *et al*, 2008).

I.7. Association des huiles essentielles

Empiriquement reconnue depuis des siècles, la confirmation scientifique de l'activité antimicrobienne des HEs reste récente. Ces dernières années, la communauté scientifique a montré un intérêt considérable dans l'étude des nouveaux antimicrobiens végétaux. La recherche des effets sur la synergie issue de la combinaison des HEs est d'actualité. En effet, l'activité antimicrobienne de ces associations, comme pour les associations d'antibiotiques, s'est avérée très efficace.

Les activités biologiques de l'association des Huiles essentielles Pour se protéger de l'action des antibiotiques, les bactéries ont élaboré plusieurs stratégies conduisant à la diminution de l'efficacité de ces médicaments. Face à ce problème de résistance, la recherche des produits, capables, par effet synergique, de contrer les stratégies élaborées par les bactéries, représente une possible solution (**Mouhi, 2017**).

La composition chimique, la qualité et la quantité extraite d'une huile essentielle dépendent de plusieurs paramètres à savoir :

- ✓ Intrinsèques: les facteurs génétiques, la localisation et le degré de maturité.
- ✓ Extrinsèques : le sol, le climat et l'environnement.
- ✓ Technologiques : type de culture, mode de récolte et mode d'extraction.

Par conséquent la composition chimique d'une huile essentielle peut varier au sein d'un même genre botanique. Parfois ces variations peuvent s'observer au sein d'une même espèce, on parlera alors de chémotypes : il s'agit d'un polymorphisme chimique (**Himed, 2011**).

Chapitre II

Généralités sur

***Staphylococcus aureus* et**

Escherichia coli

II.1. *Escherichia coli***II.1.1. Définition**

Escherichia coli a d'abord décrite par le Dr Théodore Escherich en 1885 (Nisha et Michael, 1992). *Escherichia coli* est l'espèce bactérienne qui a été la plus étudiée par les fundamentalistes pour les travaux de physiologie et de génétique. Cette bactérie est connue depuis longtemps comme commensale du tube digestif et pathogène pour l'appareil urinaire (Jean-Loup *et al*, 1997).

II.1.2. Taxonomie

Selon Bergey *et al*, (1974), *Escherichia coli* est classé comme suit :

Tableau 1: Taxonomie d'*Escherichia coli*

Règne	Bacteria
Embranchement	Procaryotae
Division	Proteobacteria
Classe	Gammaproteobacteria
Ordre	Enterobacteriales
Famille	<i>Enterobacteriaceae</i>
Genre	<i>Escherichia</i>
Espèce	<i>Escherichia coli</i>

II.1.3. Habitat

Les *Escherichia coli* ou colibacilles sont des hôtes normaux de l'intestin : ils représentent près de 80% de la flore intestinale aérobie de l'adulte (flore sous dominante, car la flore dominante est à 99% anaérobie). On peut les retrouver également au niveau de diverses muqueuses chez l'Homme et chez les animaux (**Flandrois, 1997**).

II.1.4. Morphologie

Escherichia coli est un bacille Gram négative, de 1 à 3 µm de long sur 0.5 µm de large, non sporulée et principalement mobile par des flagelles péritriches sauf certaines souches qui sont immobiles en raison de l'absence des flagelles.

Les souches extra-intestinales sont encapsulées et produisent des colonies de typemucoïde (**Douhan, 2021**).

II.1.5. Pathogénicité

Selon leur équipement de facteurs de virulence et leurs propriétés cliniques, les souches d'*Escherichia coli* peuvent être classées comme pathogènes commensaux, intestinaux ou extra-intestinaux. *Escherichia coli* qui cause des infections intestinales (diarrhéique *E. coli* (DEC) ont été classés en six patho- types : *E. coli* entéro-toxinogène (ETEC), *E. coli* entéro-invasif(EIEC), Shiga toxine productrice d'*E. coli* (STEC), *E. coli* entéro-pathogènes (EPEC), *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC), *E. coli* entéro-aggrégatif (EAEC) (**Cecilia et al, 2008**).

Escherichia coli peut causer des maladies à de nombreux endroits en dehors du tractus gastro-intestinal, notamment dans les voies urinaires, les méninges, les voies biliaires, le péritoine, les poumons, la peau et les tissus mous. Les souches à l'origine de ces infections partagent souvent plusieurs facteurs de virulence connus et supposés, et ont donc été regroupées en un seul pathotype appelé *E. coli* pathogène extra-intestinal (ExPEC). Le seul facteur de virulence connus et suspectés communs aux ExPEC, qu'ils proviennent d'infections urinaires ou d'autres sites, comprennent la capsule, les systèmes d'absorption du fer et une variété de pili,

en particulier les P fimbriae. Le sérotypage, le profilage génomique de l'ADN polymorphe amplifié de façon aléatoire, le typage des séquences multilo-cus l'électrophorèse en gel à champ pulsé révèlent que des souches étroitement apparentées de la même lignée peuvent causer des infections urinaires et des infections dans d'autres sites, ce qui justifie que les ExPEC constituent une catégorie appropriée (Kessler *et al*, 2015).

II.2. *Staphylococcus aureus*

II.2.1. Définition

Les staphylocoques furent observés pour la première fois à la fin des années 1800 par Robert Koch et Louis Pasteur. C'est à la même période que Rosenbach isolat en culture pure pour la première fois *Staphylococcus aureus* (Corne, 2004).

Staphylococcus aureus est un agent pathogène important en raison d'une combinaison de virulence Médie par la toxine, d'invasivité et de résistance aux antibiotiques (Yves le Loir *et al*, 2003).

II.2.2. Taxonomie

L'espèce type de ce genre est *Staphylococcus aureus*, selon Bergey's, (2007), elle appartient:

Tableau 2: Taxonomie de *Staphylococcus aureus*

Domaine	Bactéria
Phylum	Fermicute
Classe	Bacilli
Ordre	Bacillales
Famille	Staphylococcaceae
Genre	Staphylococcus
Espèce	<i>Staphylococcus aureus</i>

II.2.3. Habitat

Chez l'humain, on peut retrouver *Staphylococcus aureus* au niveau du nez, des aisselles ou encore dans le système gastro-intestinal. Le nez est la principale région anatomique colonisée chez l'humain (**Wertheim et al, 2005**).

II.2.4. Morphologie

A la coloration de gram, *Staphylococcus aureus* apparaît sous forme de coques à Gram positif de **0.5** à **1.0** μm de diamètre, associés par paires, en chaînettes de 3 à 5 coques, ou en amas irréguliers en grappes de raisins. il est immobile et non sporulé (**Federighi, 2005**).

II.2.5. Pathogénicité

Le staphylocoque doré est une bactérie qui peut causer diverses maladies par des moyens suppuratifs ou non suppuratifs (à médiation toxique). *Staphylococcus aureus* est une cause fréquente d'infections de la peau et de la structure de la peau ainsi que des infections ostéo-articulaires dans la population pédiatrique. Il est également identifié dans les cas de septicémie, d'endocardite infectieuse, de pneumonie, d'infections oculaires et d'infections du système nerveux central (**Devlynne, 2018**).

Staphylococcus aureus représente un enjeu en santé publique par sa grande diversité d'infections, sa gravité, sa fréquence mais également en raison de l'émergence de souches multi-résistantes aux antibiotiques.

Son pouvoir pathogène résulte de la sécrétion d'enzymes (catalase, coagulase, désoxyribonucléases, phosphatases, hyaluronidases, fibrinolysines, lipases et protéolysines) et de toxines (hémolysines, leucocidines, entérotoxines, exfoliatines) qui lui confèrent respectivement son pouvoir invasif et toxinogène. Cette bactérie est, avant tout, une bactérie pyogène responsable de la plupart des infections suppurées de la peau et des muqueuses. Les principales staphylococcies cutanées sont dues à la pénétration et la multiplication de la bactérie dans les annexes de la peau qui provoquent un large panel d'infections : folliculites, furoncles, anthrax, orgelets, panaris, impétigo ou abcès. Les infections toxiques, quant à elles, sont dues à la diffusion dans les tissus de toxines spécifiques qui provoquent plusieurs types d'infections : le choc toxique staphylococcique, le syndrome d'exfoliation, l'impétigo bulleux ou encore des toxi-infections alimentaires (**Lays, 2006**).

Chapitre III

Généralités sur les plantes utilisées.

III.1. Eucalyptus globulus

III.1.1. Historique

Les eucalyptus sont utilisés pour soigner depuis des milliers d'années en Australie, continent d'origine. Les feuilles étaient utilisées par les Aborigènes pour traiter les fièvres (notamment la malaria), d'où son nom commun d'arbre à la fièvre ou *Australian fever tree*. Les Aborigènes vivants en Tasmanie avaient également compris l'intérêt de l'eucalyptus par sa capacité à assécher les zones marécageuses pour éradiquer les insectes, porteurs de maladies. L'eucalyptus a été découvert par l'explorateur et botaniste français Jacques-Julien Houtou de La Billardière en 1792, en Australie. Quand les premiers explorateurs arrivèrent sur les littoraux de ce continent, ils virent d'énormes forêts d'eucalyptus et baptisèrent ce nouveau continent « Le pays des brouillards bleus ». Le nom botanique fut créé par le botaniste français Charles-Louis L'Héritier de Brutelle en 1792. Les eucalyptus furent introduits en France en 1828. De nombreux pays ont rapidement intégré les usages médicaux des feuilles d'eucalyptus dans leur pharmacopée : Chine, Inde, Sri Lanka, Afrique du Sud, île de La Réunion et pays européens. La production commerciale d'huile essentielle (HE) d'eucalyptus a débuté en 1860, dans la région de Victoria en Australie.

Actuellement, l'Australie, le Maroc, l'Espagne et certains pays de l'Europe de l'Est sont parmi les principaux producteurs. Au XIXe siècle, on utilisait l'HE pour aseptiser les cathéters urinaux dans les hôpitaux anglais. De nos jours, elle entre dans la fabrication de rince-bouche (Listerine, par exemple) et de dentifrices, de nombreuses préparations pharmaceutiques destinées aux diverses affections des voies respiratoires et de solvants endodontiques utilisés en dentisterie. On s'en sert aussi comme dégraissant industriel (**Boukhatem et al, 2017**).

III.1.2. Description

Les eucalyptus sont des arbres qui poussent très rapidement. *L'Eucalyptus globulus* mesure 30 à 60 mètres de haut et il peut atteindre jusqu'à 100 mètres dans certains cas. Son troc est lisse et sa couleur varie du blanc au gris. Son écorce se détache facilement en longues bandes. Les jeunes feuilles sont cireuses, ovale claires, opposées et sessiles. Mais ce sont les feuilles poussant sur les vieilles branches qui sont officinales car ce sont les seules à posséder des poches à essence sur la face inférieure. Ces feuilles peuvent atteindre 25centimetre de long. Elles sont falciformes, alternes, pétiolées, de couleur gris-vert. Les feuilles ont une nervure principale surtout distincte sur la face inférieure. La plante coupée est reconnaissable par la présence de nombreuses poches sécrétrices sur la face inférieure de la feuille (**Koziol, 2015**).



Figure 2: Feuilles d'*Eucalyptus globulus*

III.1.3. Composition chimique d'*Eucalyptus globulus*

Les principaux composants chimiques des genres Eucalyptus sont (**Carnesecchi, 2001**):

- ✓ Huile essentielle (Oxydes terpéniques : 1,8-cinéole; monoterpènes : alpha-pinène, limonène, gamma-terpinène, paracymène ; Sesquiterpènes : aromadendrone ;

Sesquiterpénols : globulol, lédol).

- ✓ Flavonoïdes (des hétérosides de flavones avec les aglycones suivants : quercétine, myricétine, kaempférol et rutine).
- ✓ Tanin.

III.1.4. Propriétés

L'eucalyptus est surtout un puissant remède des maladies des voies respiratoires. Excellent antiseptique des bronches, il entre d'ailleurs dans nombre de sirops et suppositoires spécialisés en pharmacie. On l'emploie dans les bronchites aiguës ou chroniques et, plus généralement, dans toutes les affections respiratoires (irritation) de la gorge, des muqueuses nasales), les rhumes, les gripes et les maux de gorge.

À la fois apéritif et digestif, il rend, de plus, de précieux services à des malades dont le système digestif est souvent perturbé par leurs ennuis respiratoires.

L'huile essentielle distillée des feuilles, diluée dans de l'huile d'amande, en frictions sur le corps, soulage les rhumatismes et les névralgies aussi bien que les maladies respiratoires.

Fumées en cigarettes, les feuilles sèches et broyées d'eucalyptus étaient un remède reconnu contre l'asthme.

Antiseptiques, les vapeurs d'eucalyptus sont mises à profit sous forme d'inhalations contre les rhumes, les gripes, ...etc (**Debuigne et Couplan, 2019**).

III.2. *Mentha Spicata* (menthe verte)

III.2.1. Historique

Le genre *Mentha* compte un très grand nombre d'espèces et les hybridations successives entraînent une certaine confusion dans leur identification. Il est donc impossible de mettre un

nom botanique sur les espèces de Menthe évoquées dans l'Antiquité. La menthe a été célébrée dans la mythologie grecque et latine au travers de la nymphe Mentha, la fille du dieu des rivières. Hadès, le dieu des enfers marié à Perséphone en tomba amoureux. L'épouse jalouse tua Mentha et la piétina jusqu'à la réduire en pièces. Hadès la transforma en plante aromatique qui séduisait par son parfum. La menthe fût alors considérée comme bénéfique contre le mal. La plante était déjà connue des Egyptiens. Il a été retrouvé des fragments de plante séchée dans des tombeaux remontant aux XIII^e et XVII^e siècles av. J.-C., elle était utilisée pour la conservation des momies. Probablement en raison de son fort arôme, la menthe était utilisée avec le myrte et le romarin durant les cérémonies funéraires, afin de masquer l'odeur des cadavres. Les penseurs grecs étaient opposés à Aristote et Hippocrate qui disaient que la menthe tuait le courage tant elle incitait à l'amour et en interdisaient donc l'utilisation par les soldats. Le temps leur a donné raison mais c'est loin d'être sa seule vertu. Dioscoride et Pline affirmaient qu'elle constituait un facteur de stérilité : « la menthe tue le fœtus et s'oppose à la reproduction en empêchant la coagulation du sperme » A la fin du VIII^e ou au début du IX^e siècle, Charlemagne a fait rédiger un ordonnancement, le capitulaire De Villis (« Capitulare Caroli Magni de villis vel curtis imperia libus ») par un moine bénédictin, l'abbé Ansegis. Il regroupe un certain nombre d'ordres ou de recommandations à l'intention des gouverneurs de ses domaines. Cet acte législatif est surtout connu pour son article 70 qui contient la liste d'une centaine de plantes que les domaines royaux, les monastères et les fermes, doivent cultiver et où l'on retrouve la culture de la menthe. Trois cultures sont mentionnées pour les domaines impériaux : Sisymbrium, Menta (une « menthe sauvage ») et Mentastrum. La thérapeutique du Moyen-Age fait fréquemment appel à ces diverses espèces, le Sisymbrium représentant approximativement la menthe verte. Elle était utilisée pour traiter les rhumes ou certains troubles digestifs. Le terme de menthe apparaît en 1275 dans la littérature française. Au XVI^e siècle, les menthes sont encore utilisées pour de multiples emplois qui en faisaient une véritable thérapeutique, tandis qu'elles ont ensuite progressivement atteint un rôle secondaire, qui est aujourd'hui le leur. La menthe verte est actuellement utilisée surtout en Angleterre, aux Etats-Unis, au Moyen et Proche-Orient,

dans les Balkans, en France et en Inde, principalement comme épice, surtout en accompagnement de plats salés (**Carlier-Loy, 2015**).

III.2.2. Description

Plante vivace, robuste, de 50 cm à 1 mètre, d'un vert sombre, à odeur suave très pénétrante.

Feuilles : Les feuilles sont opposées persistantes, sur les 2 faces, glabres ou presque glabres. L'implantation des feuilles est paripennée et décussées (avec un angle de 90°).

Fleurs : Les fleurs poussent en grappe à l'aisselle de la feuille. Elles sont hermaphrodites. Les fleurs sont rosées ou lilas, en épis terminaux peu denses, longs, grêles, linéaires-aigus ; bractées et dents du calice linéaires, glabres ou ciliées ; pédicelles et tube du calice glabres ; corolle glabre en dedans ; c dépasse les pièces florales, la fleur est pentamère oligostémone et ses pétales sont soudés (gamopétales).

Inflorescence : L'inflorescence est indéfinie en épi cylindrique dense.

Tige : La tige de la menthe verte est dite quadrangulaire (carrée) ascendante (orthotrope). Elle est de couleur pourpre. La taille de la menthe verte peut atteindre au maximum une hauteur de 1,20 mètre mais en moyenne varie entre 0,30 et 0,60 m. Les tiges glabres ou glabrescentes, rameuses. La menthe verte est une plante à rhizomes traçants.

Racines : La racine est une racine pivotante qui dure plus de 3 ans. On les trouve en dessous de chaque pied, des rhizomes (tiges souterraines) servent à la propagation de la plante (**Douay, 2009**).



Figure 3: Menthe verte (*Mentha spicata*)

III.2.3. Composition biochimique de *Mentha spicata*

Les composants biochimiques de *Mentha spicata* L. Algérienne sont (Brahmi *et al*, 2016) :

- ✓ Carvone, limonene, 1.8-cineole, β -Caryophyllene germacrene D.
- ✓ Composants phénoliques : Acides Acide 4-hydroxy benzoïque, Acide caféique, Acide α -coumarique, Acide chlorogénique et Acide rosmarinique.
- ✓ Flavonoïdes : Rutine, naringénine, luteoline, diosmine, kaempferole et diosmetine
- ✓ Autres composants : Esters méthilique d'acide gras, triglycéride, squalène, stigmastérol, Sitostérol, acide oléanolique, ursolique et pomolique Caroténoïdes, alcaloïde, saponine.

III.2.4. Propriétés

Les effets bénéfiques de la menthe verte sont très nombreux ; elle agit comme stomachique, tonique, stimulant digestif, analgésique, diurétique, carminative, antispasmodique ... Les feuilles fraîches s'utilisent en cuisine: sauce, salades, thé, infusion. L'huile essentielle est utilisée à grande échelle dans l'industrie alimentaire pour la préparation de sucreries, boissons: sirops. Elle

sert également pour parfumer les produits d'hygiène buccale, les dentifrices (**Anton, 2005**).

III.3. Origan

III.3.1. Historique

Discoride, il y a deux mille ans, disait déjà de l'origan qu'il était un des meilleurs remèdes pour ceux qui ont perdu l'appétit. Il est, en effet, un apéritif remarquable, en même temps qu'il facilite la digestion en stimulant l'estomac paresseux et qu'il lutte contre la constipation. Leclerc le recommandait particulièrement aux estomacs atoniques et dilatés (**Debuigne et Couplan, 2019**).

III.3.2. Description

L'origan est une plante herbacée pousse dans un terrain montagneux inaccessible de la région sud-méditerranéenne, mais on la trouve aussi en Asie centrale et Europe.

Plante vivace de 30-80 cm de hauteur, poilue, souvent rougeâtre, aromatique. Elle possède une tige dressée, rameuse, avec des feuilles pétiolées, ovales ou elliptiques, Vaguement denticulées ou entières. Ses fleurs roses, subsessiles, en épis ovoïde-ssubtéragones agglomérés au sommet des rameaux et formant une panicule.

Les bractées sont larges, ovales-lancéolées, d'un rouge violet, dépassant le calice. Celui-ci tubuleux en cloche, à 13 nervures, à gorge barbue, à 5 dents presque égales.

La corolle bilabée, à tube saillant, à lèvre supérieure dressée, plane, émarginée, L'inférieure étalée, trilobée. On y trouve 04 étamines didynames, droites, divergentes dès la base. Anthères à loges divergentes. Carpelles ovoïdes, lisses. Varie à Bractées vertes et fleurs blanches, à épis longs et prismatiques rouges (*O. creticum L.*, *O. megastachyum L*) (**Chabane et al, 2015**).



Figure 4: *Origanum sp*

III.3.3. Composition chimique de l'origan

L'Origan est connu largement dans le monde des herbes et des épices pour ses huiles volatiles riches en mono terpènes phénoliques principalement le carvacrol, de temps en temps thymol (et d'autres composés présent dans l'Origan sont habituellement de moins d'importance quantitativement tels que des monoterpènes acycliques comme, géraniol, acétate géranylique, linalool, acétate linalylique et β -myrcène et des composés bornanes tels que le camphène, camphre, bornéol, bornyle et acétate d'isobornyle . En outre, quelques sesquiterpènes, tels que caryophyllène, le bisabolène, bourbonnène, germacrene-D, humulène, muurolène, muurolène, γ -cadinène, (-)- α -copaène, α -cadinol, oxyde de caryophyllène (Sari, 2011).

III.3.4. Propriété

Ses propriétés thérapeutiques sont comme suit (Debuigne *et al*, 2019) :

Les sommités fleuries de l'origan sont renommées contre l'inflammation aiguë ou chronique des bronches. Expectorantes, elles sont aussi sédatives de la toux et constituent un excellent traitement des maladies des voies respiratoires, un des plus agréables aussi.

La plante jouit de propriétés stimulantes et même excitantes qui la font recommander aux personnes souffrant d'asthénie, ainsi qu'aux jeunes filles, dont il facilite la venue des règles.

On l'emploie également dans le rhumatisme aigu ou chronique, non seulement sous forme de tisane, mais aussi en applications chaudes sur le membre douloureux (**Debuigne *et al*, 2019**).

Deuxième Partie

Partie Expérimentale

*Chapitre IV Matériel
et Méthodes*

IV.1. Objectif du travail

Notre travail a pour objectifs les points suivants :

1. Extraction des huiles essentielles de trois plantes aromatiques (*Eucalyptus globulus*, *Mentha spicata* et *Origanum* sp.).
2. Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles ;
3. Evaluation de l'association de deux huiles essentielles.

IV.2. Lieu et période de travail

Notre travail a eu lieu au niveau du laboratoire de biochimie pour l'extraction des huiles essentielles, et au niveau du laboratoire de microbiologie de la *Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Ibn Khaldoun- Tiaret*, pour les tests de sensibilité des souches aux huiles essentielles étudiées, pendant une période de temps s'étendant de février à mai 2022.

IV.3. Matériel

IV.3.1. Matériel végétal

Le matériel végétal qui a servi pour les différentes analyses et techniques était constitué de trois plantes (*Eucalyptus globulus*, *Mentha spicata* et *Origanum* sp.).

La récolte de l'eucalyptus était effectuée dans la région de ZAAROURA-Tiaret, pendant le mois de février 2022 et identifiée par *Dr. Ait Hamou*, botaniste à la *Faculté des Sciences de la Nature et la Vie, Université Ibn Khaldoun- Tiaret*. La menthe utilisée provenait du sud algérien et l'origan provenait de la wilaya de Tissemsilet (Wanchariss). Les deux dernières plantes ont été achetées chez un herboriste à Tiaret.

Avant l'utilisation, les trois plantes ont été séchées à l'air libre à l'ombre et à température ambiante pendant une période de 21 jours.

IV.3.2. Matériel biologique

L'activité antibactérienne des huiles essentielles des feuilles de *Eucalyptus globulus*, de *Origanum* sp, et de *Mentha spicata* ont été évalué sur deux souches de référence : une souche gram négatif *Escherichia coli* ATCC 25922 et une souche gram positif *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

IV.3.3. Matériel du laboratoire

Le matériel et les produits utilisés dans notre travail sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 3: Matériel de laboratoire et produits utilisés.

Appareillage et autres	Verreries et autres	Produits et milieu de culture
-Spectrophotomètre	- Ballon 500ml et 1000ml	-Eau distillé stérile
-Incubateur	-Réfrigérant oblique	-Mueller Hinton agar
-Balance	-Bac bunsen	-Milieu Chapman
-Agitateur (vortex)	-Erlenmeyer250ml	-Milieu Macconky
-Autoclave	-Pissette	-L'eau physiologie
-Bain marie	-Verre de montre	-Hydroxyde sodium
-Minuteur	-Béchers 600ml et 250ml	-tween80
		-TTC 2,3,5
-Réfrigérateur	-Tube à essais	triphényltétrazolium
-Pied à coulisse	-Ecouvillon	-L'eau distillé stérile
	-Boite du pétrie	
	-Anse de l'ensemement	
	-Anse de platine	
	-Eprouvette	
	-Micropipette	
	-Les ampoules à décanter (5µm)	
	-Un portoir	
	-Cuve de spectrophotométrie	
	-un support élévateur	
	-une potence (support)	
	-pince	
	-barrot	
	-Papier wattman (6nm)	
	-les embouts	
	-les eppendorfs	
	-les plaques micro titration	

IV.4. Méthodes

IV.4.1. Protocole expérimental

Les étapes du protocole expérimental sont présentées dans la figure suivante:

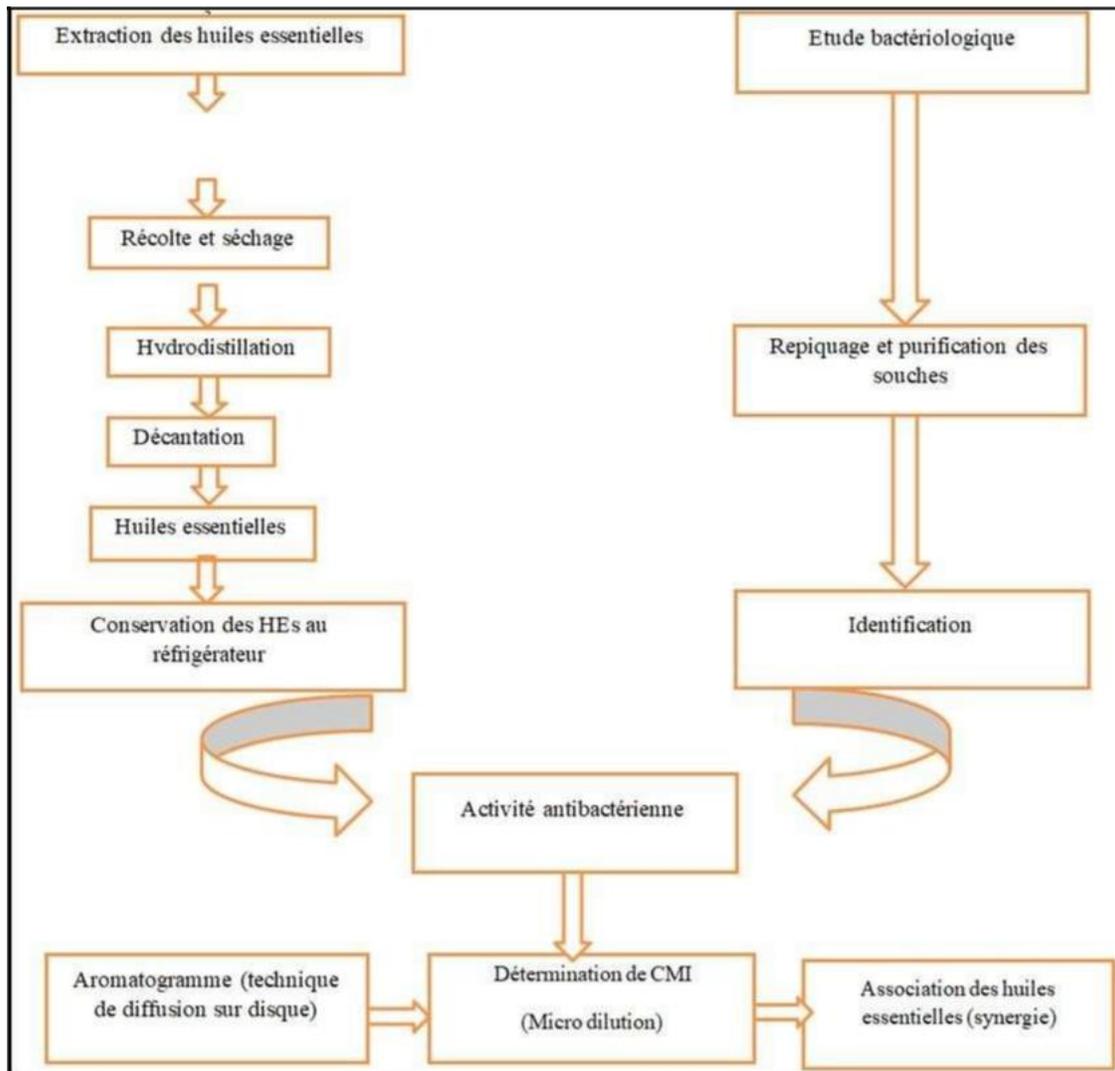


Figure 5: Schéma général du protocole expérimental.

IV.4.1.1. Extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles a été réalisée dans un dispositif de *Clevenger*, par la méthode d'hydrodistillation. Ce dispositif est constitué d'un ballon en verre pyrex où l'on place le matériel végétal et de l'eau distillée sur un bec bunsen, une colonne de condensation de la vapeur (réfrigérant) et un collecteur en verre pyrex (ampoule) également qui reçoit les extraits de la distillation.

Les feuilles des plantes ont été mises dans un ballon en verre pyrex (50 grammes de matières végétales pour l'origan, la menthe, et l'eucalyptus), additionnées de 500 ml d'eau distillée. L'ensemble est porté à ébullition, lors de l'apparition de la première goutte du distillat à la sortie du tube de condensation de la vapeur l'huile essentielle est alors entraînée par la vapeur d'eau. Elle est ensuite condensée en passant par un condensateur, fixé par un support approprié en position horizontale inclinée légèrement pour faciliter l'écoulement du distillat. Le temps de cette extraction est d'environ 2 heures. Le distillat obtenu est récupéré dans une ampoule à décanter. Le mélange est laissé au repos quelques minutes. En fin l'huile essentielle est séparée du distillat par décantation puis récupérée dans un flacon approprié.



Figure 6: Dispositif d'hydrodistillation.

IV.4.1.2. Revivification des souches

L'objectif de cette étape était d'assurer la pureté des souches et procéder à la revivification des souches des bactéries de référence *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*.

Les souches bactériennes ont été fournies par le laboratoire de microbiologie de la *Faculté des Sciences de la Nature et la Vie, Université Ibn Khaldoun- Tiaret*.

Ensemesement

Les bactéries sont prélevées à l'aide d'un écouvillon stérile, l'ensemencement consiste à beurrer un milieu nutritif solide en vue d'obtenir une culture bactérienne abondante.

Il suffit ensuite de prélever des bactéries sur la gélose ensemencée afin de poursuivre leur étude.



Figure 7 Technique d'ensemencement

Dans l'examen microscopique on a opté pour la coloration de gram (Claus, 1992), qui est un examen préliminaire dans l'identification des souches bactériennes tel que *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*, afin de déterminer leur morphologie et leur type (Gram positif ou Gram négatif).

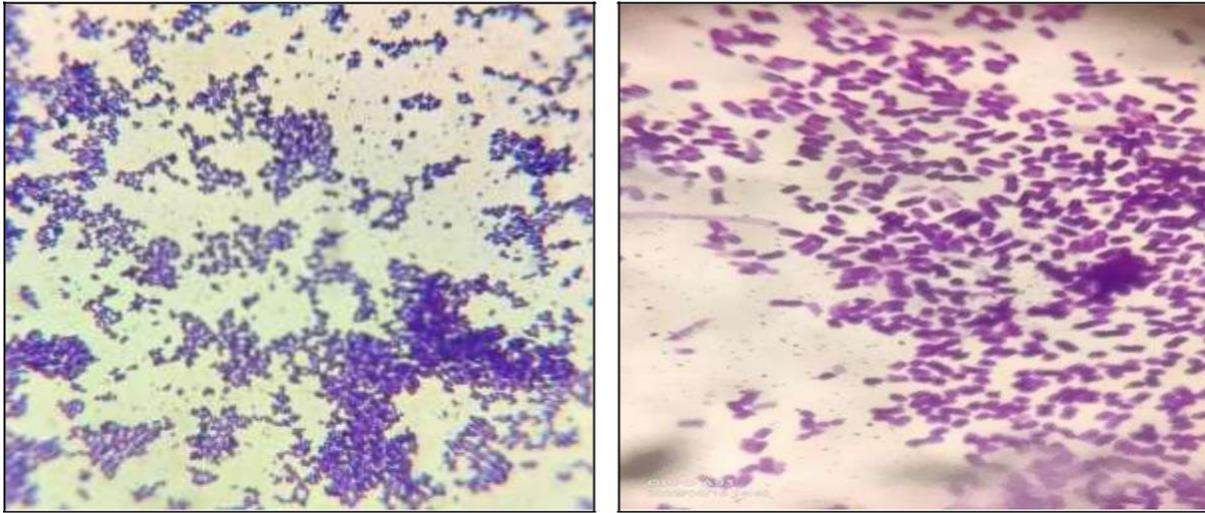
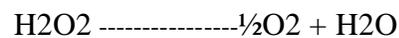


Figure 8: Microscopie optique de *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* (10*100)

Des tests d'orientation rapides sont réalisés en fonction des résultats des caractères morphologiques et cultureux.

- **Test de catalase**

C'est une enzyme décomposant l'eau oxygénée en eau et en oxygène gazeux.



La méthode consiste à prélever une colonie bactérienne à étudier sur l'extrémité d'une anse que l'on plonge ensuite dans une goutte d'eau oxygénée (à l'aide d'une pipette Pasteur). Le dégagement de bulles gazeuses signe la présence de l'enzyme.

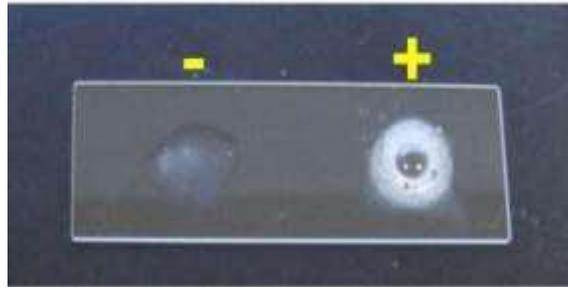


Figure 9: Test de catalase.

• **Test d'oxydase**

Appelé aussi phénylène diamine oxydase est une enzyme intervenant dans divers couples d'oxydo-réduction. Ce test est à la base de l'identification des bactéries Gram négative.

Pour ce test, on a placé un disque d'oxydase sur une lame propre et stérile. Ensuite, on a disposé à l'aide d'une pipette Pasteur (il est strictement interdit d'utiliser l'anse de platine pour ne pas fausser le résultat) une goutte de suspension bactérienne pure sur " un disque oxydase", celui-ci contient de l'oxalate de diméthyl paraphénylène diamine. Les bactéries oxydase-positives donnent rapidement une coloration violette foncée ; dans le cas contraire, il n'y a pas de coloration (Boussena, 2019).



Figure 10: Test d'oxydase

IV.4.1.3. Evaluation de l'activité antibactérienne

Les différentes souches bactériennes (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*) ont été repiquées par la méthode des stries, puis incubées 37c à l'étuve 37 C° pendant 18h à 24h afin d'obtenir des colonies isolées et une culture jeune qui vont servir à la préparation de l'inoculum (**Moroh et al, 2018**).

A partir d'une culture pure de 18-24 heures, on a prélevé quelques colonies bactériennes bien isolées pour la préparation de l'inoculum à 0,5 McFarland. A l'aide d'une pipette Pasteur stérilisée, les colonies sont déchargées dans 5ml d'eau peptonée pour la préparation de la suspension bactérienne à 0,5 McFarland (soit 108 UFC/ml). L'inoculum est préparé à l'aide d'un spectrophotomètre, et la lecture est faite avec une absorbance réglée à 625nm pour une densité optique (D.O.) de 0,08 à 0.13.

Méthode de diffusion sur disque ou aromatogramme

L'aromatogramme est une technique dérivée de la méthode des disques, ils permettent de comparer les efficacités des HEs entre elles. Les disques étant tous chargés de la même quantité d'HE, cette méthode permet de choisir pour une bactérie donnée, l'HE la plus efficace. Cependant, les recommandations et normes officielles ne se fondent pas sur des résultats relatifs, mais sur des valeurs chiffrées (**Stéphane et al, 2015**).

On remplit des boites pétris par Muller-Hinton et laisser refroidir, après à l'aide d'écouvillon on prend suspension standardisé et on fait l'ensemencement des deux bactéries (*Escherichia coli* ; *Staphylococcus aureus*). Ensuite on applique deux disques en papier wattman (6nm) Sur la surface de gélose avec une pince stérile, puis on imbibe l'un des deux disques avec 5 µl de l'HE et 5µl d'eau physiologie sur l'autre disque (témoin négatif), puis on réalise une incubation à 37 °C pendant 18 à 24h.

Après l'incubation on mesure les diamètres d'inhibition en millimètre à l'aide d'un pied à coulisse.

La sensibilité aux différentes huiles essentielles est classée selon le diamètre de l'halot de la zone d'inhibition : insensible (-) si le diamètre de la zone d'inhibition est moins de 8mm sensible (+) avec des diamètres compris entre 9 et 14 mm ; très sensible (++) pour des diamètres de 15 à 19 mm ; et extrêmement sensible (+++) pour des diamètres plus de 20 mm (**Ponce *et al*, 2003**).

Les expériences ont été réalisées en triplicata (en trois exemplaires).

Détermination concentration minimale inhibitrice (CMI)

La CMI est définie comme étant la concentration la plus faible de la substance antimicrobienne qui inhibe la croissance des micro-organismes. La détermination des CMI des extraits de plantes vis-à-vis des souches étudiées est réalisée selon la technique de microtitration sur plaques à 96 puits (**Edition, 2012**).

Après 24 h de culture sur gélose nutritive à 37°C, les suspensions bactériennes ont été préparées dans 5 ml de solution saline à 0,85% et ajustées à 0,5 Mc Farland.

Une solution mère des huiles essentielles a été préparée en utilisant du Tween 80 dissous dans de l'eau distillée stérile (1/9, v/v), à partir de laquelle on a préparé des solutions finales par double dilution.

Des solutions primaires ont été préparées à partir de la solution mère par dilution en série en utilisant du Tween 80 dissous (10%) dans des tubes à essai stériles pour atteindre des concentrations en huile essentielle de: (1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 et 1/320).

Les solutions finales des huiles essentielles ont été obtenues à partir de solutions primaires en ajoutant de manière aseptique 0,5 ml de la solution primaire préparée à 4,5 ml de bouillon Mueller-Hinton pour obtenir des concentrations finales de : 1/10, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600, 1/3200, 1/6400 et 1/12800 (v/v). Des volumes de 95µl des solutions diluées finales ont

été distribués dans les puits de la plaque de microtitration, et 5µl des inocula préparés ont été ajoutés aux puits correspondants. Des témoins positifs de croissance (sans huile essentielle) et des témoins négatifs de stérilité (sans bactéries) ont été réalisés. La détermination de la CMI a été faite en triplicata.

A l'issue de l'incubation des plaques contenant les bactéries et les suspensions des huiles essentielles à 37°C pendant 24 h, 20µl de chlorure de 2, 3,5-triphényltétrazolium (TTC) à 0,5% ont été ajoutés à chaque puits. La CMI a été enregistrée comme étant la plus faible concentration en huile essentielle pour laquelle aucune croissance n'a été visualisée (**Edition, 2012**).

La distribution des huiles essentielles à différentes concentrations dans les plaques de microtitration a été réalisée selon le schéma suivant :

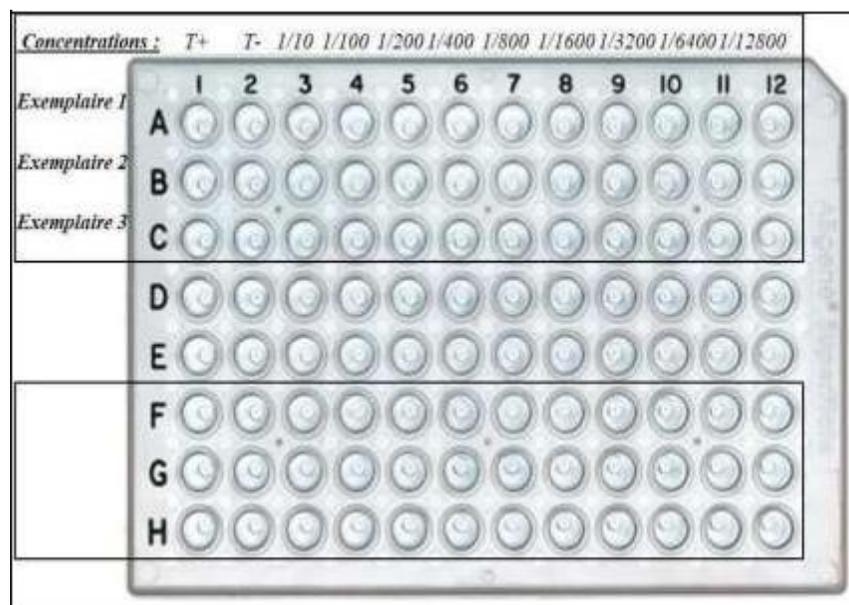


Figure 11 : Plaque de microtitration (Détermination de la CMI).

Détermination de la Concentration Inhibitrice Fractionnaire (CIF) et de l'indice CFI (ICFI)

L'effet combiné des deux HEs (ICFI) a été évalué par la méthode de microdilution.

Les dosages ont été effectués sur des plaques de microtitration en polypropylène à 96 puits sur la base des valeurs CMI des huiles essentielles précédemment obtenues. Six concentrations des HEs de l'origan et de la menthe ont été préparées (4CMI₀, 2CMI₀, CMI₀, CMI₀/2, CMI₀/4 et CMI₀/8). 190 µl de chaque dilution origan HE ont été ajoutés sur l'axe des (x) à travers la plaque en damier, tandis que le HE de la menthe à différentes concentrations ont été distribuées sur l'axe des (y) afin d'obtenir les concentrations finales CFI préparées (4CMI₀, 2CMI₀, CMI₀, CMI₀/2, CMI₀/4 et CMI₀/8) (Figure 14).

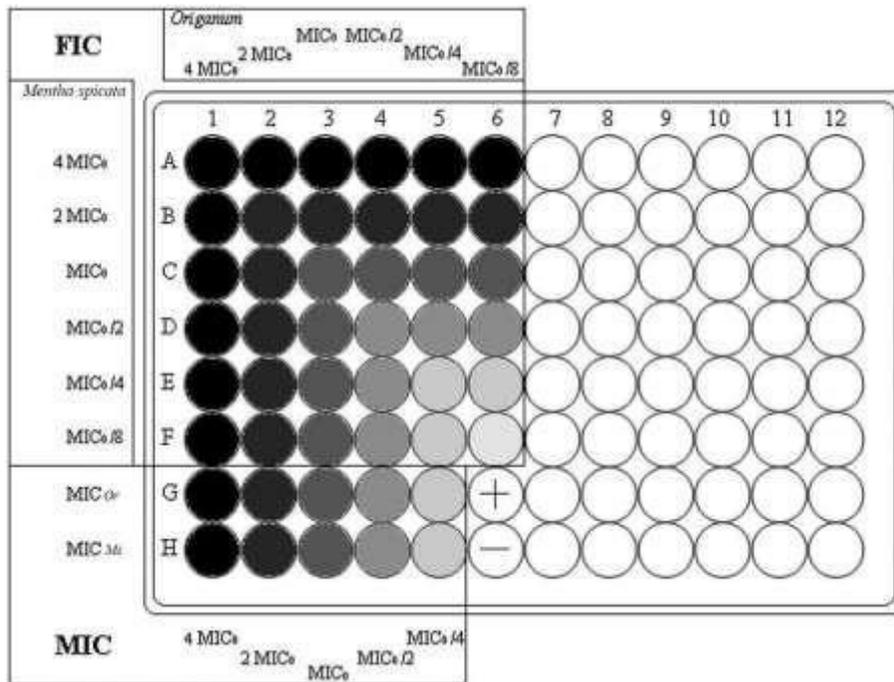


Figure 12: Méthode de détermination de la CIF.

Dix µl de suspension bactérienne standardisée à 0,5 McFarland de turbidité standard ont été ajoutés dans chaque puits, sauf le contrôle négatif qui a été additionné de 10 µl de bouillon BHI stérile. Les microplaques ont été incubées à 37°C pendant 24h en chambre humide. Les déterminations CIF ont été effectuées en triple. Pour chaque réplique, les valeurs ICIF ont été calculées en utilisant les Formule :

$$ICIF = CIF \textit{ origan} + CIF \textit{ Mentha spicata}$$

Où

$$CIF \textit{ origan} = CMI \textit{ origan en combinaison} / CMI \textit{ origan seul} ;$$

$$Et : CIF \textit{ Mentha spicata} = CMI \textit{ Mentha Spicata en combinaison} / CMI \textit{ Mentha Spicata seul}.$$

Les valeurs ICIF ont également été interprétées selon le modèle conventionnel proposé par **Odds, (2003)** et **EUCAST, (2000)**. Selon **Odds, (2003)** un effet synergique (Syno) est observé lorsque la valeur CFII < 0,5 ; un effet Indifférent (Indo) lorsque 0,5 < valeur ICFI < 4 et un effet Antagoniste (Anto) lorsque valeur CFII > 4 (**Filippo et al, 2017**).

Chapitre V
Résultats et
Discussion

V.1. Aromatogramme

L'évaluation de l'activité antibactérienne des HEs de *Eucalyptus globulus*, du *Mentha spicata* et de l'origan (*Origanum sp.*) par la méthode de diffusion sur disque nous a donné les résultats suivants :

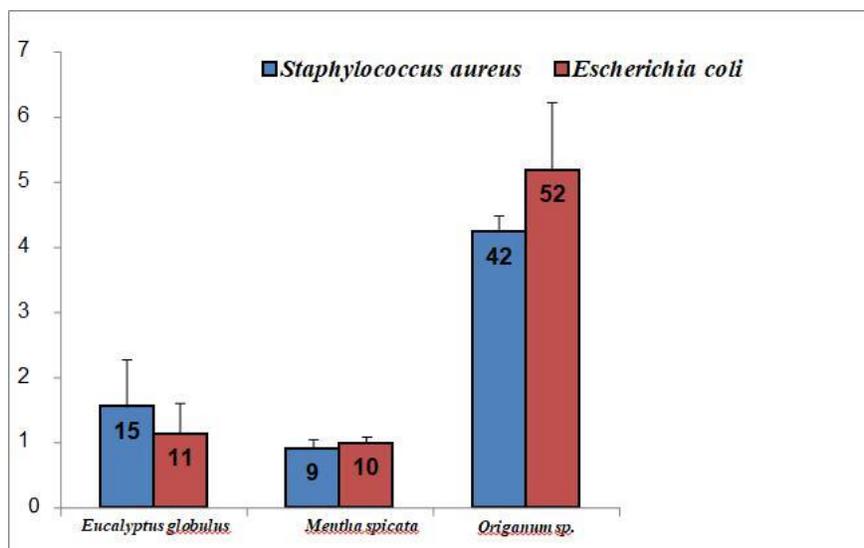


Figure 13: Résultats de l'aromatogramme

Les résultats de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de l'origan ont montré que cette huile essentielle possède une forte activité antibactérienne vis-à-vis des 2 souches testées (*Staphylococcus aureus* ainsi que *Escherichia coli*), avec des diamètres d'inhibition compris entre 42 ± 2.46 mm et 52 ± 10.4 mm. D'après la classification proposée par **Ponce et al, (2003)**, les 2 souches testées se sont révélées extrêmement sensibles à cette huile essentielle vue que les diamètres d'inhibitions étaient supérieurs à 20mm. Nos résultats sont semblables à ceux de **Bekka, (2009)**, elle a trouvé les zones d'inhibitions pour *E. coli* 51mm et pour *s. aureus* 42 mm

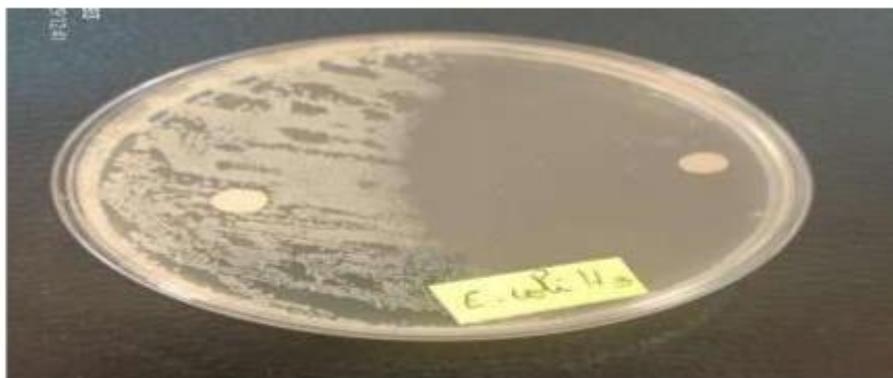


Figure 14 : Diamètres des zones d'inhibitions de la souche *E. coli* de l'HE de l'origan



Figure 15 Diamètres des zones d'inhibitions de la souche *S.aureus* de l'HE de l'origan

L'huile essentielle de l'eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) a montré une bonne activité antibactérienne vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et d'*Escherichia coli*. *Staphylococcus aureus* s'est révélée très sensible alors qu'*Escherichia coli* s'est révélé sensible (zone d'inhibitions comprises entre $15 \pm 7,31$ et $11 \pm 4,79$). Nos résultats sont semblables à ceux de **Samoussa et al, (2018)**. Ils ont trouvés les zones d'inhibitions pour *E. coli* 12mm et pour *S.aureus* 15mm.

Selon **Changriha, (1998)**, les bactéries gram positif sont plus sensibles que les bactéries gram négatif.



Figure 16 : Diamètres des zones d'inhibitions de la souche *E. coli* de l'HE d'*Eucalyptus globulus*



Figure 17 : Diamètres des zones d'inhibitions de la souche *S.aureus* de l'HE d'*Eucalyptus globulus*

Enfin, l'huile essentielle de la menthe (*Mentha spicata*) a présenté une très faible activité antibactérienne en comparaison aux autres huiles essentielles testées vis-à-vis des deux souches de référence avec des diamètres de zone d'inhibition de $9 \pm 1,4$ mm et $10 \pm 0,48$ pour *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, respectivement. Les diamètres des zones d'inhibitions obtenus sont inférieurs à ceux obtenus par **Idderm et al, (2009)**, qui ont enregistré des diamètres de 19 mm pour *Staphylococcus aureus* et 24 mm pour *Escherichia coli*. Par contre en comparant

notre résultats avec ceux de **Adli et al,(2022)** , il apparait que les HEs agissent aussi bien sur les bactéries gram positif que sur les bactéries gram négatif, cependant, les bactéries gram négatif sont moins sensibles.

Le test préliminaire pour évaluer l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de la menthe vis-à-vis des souches testées nous a montré que ces bactéries sont légèrement sensibles à cette huile essentielle et que l'huile essentielle de la menthe possède la plus faible activité antibactérienne en comparaison à celles obtenues avec les HEs de l'origan et de l'eucalyptus.



Figure 18 : Diamètres des zones d'inhibitions de la souche *Staphylococcus aureus* de l'HE de *Mentha Spicata*



Figure 19 : Diamètres des zones d'inhibitions de la souche *E. coli* de l'HE de *Mentha Spicata*

V.2. Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

La détermination des paramètres d'inhibition (CMI) nous a permis non seulement de confirmer

les résultats obtenus mais aussi de quantifier l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de l'*Eucalyptus globulus*, de la menthe et de l'origan vis-à-vis des microorganismes testés. Les résultats de sensibilité des souches de *Staphylococcus aureus* et d'*Escherichia coli* par la méthode de microdilution sont comme suit :

Tableau 4: Résultats de la CMI

Souches	Huiles essentielles					
	<i>Eucalyptus globulus</i>		<i>Mentha spicata</i>		<i>Origanum sp.</i>	
	v/v (µl/ml)	%	v/v (µl/ml)	%	v/v (µl/ml)	%
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	0.05	10	0.1	5	0.05
<i>Escherichia Coli</i>	100	1	10	0.1	10	0.1

La concentration minimale inhibitrice des huiles essentielles est en corrélation avec les résultats obtenus par la méthode de diffusion sur disque (aromatogramme), autrement dit plus le diamètre de la zone d'inhibition est large plus la CMI est meilleure. C'est le cas pour les souches testées de *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* qui ont donné les CMI mentionnées dans tableau ci-dessus.

V.2.1. Concentration minimale inhibitrice de l'origan

Les souches de *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* se sont montrées sensibles à l'huile de l'origan à des concentrations de 5 µl/ml pour *Staphylococcus aureus* et de 10 µl/ml pour *Escherichia coli*. A partir de tous ces résultats on constate que l'HE de l'origan est très efficace contre les souches testées.

Selon **Burt, (2004)**, l'activité d'une huile essentielle est directement liée à sa composition chimique, qui peut varier d'un échantillon à l'autre et évoluer au cours du temps.

L'importante bio-activité de l'HE de l'origan est en relation avec sa teneur élevée en carvacrol et en thymol. En effet, les HEs riches en dérivés phénoliques (carvacrol et thymol) possèdent une forte activité antimicrobienne (**Amarti et al, 2011**).

En effet, plusieurs auteurs **Kintziosn, (2002)** ; **Carneiro de Barros et al, (2008)** ; **Leite de Souza et al, (2009)**, ont montré que l'activité antibactérienne est due à la présence dans l'huile essentielle de ces composés phénoliques (carvacrol et ou thymol). De la même, la position relative du groupe hydroxyle au sein de la structure phénolique peut contribuer au pouvoir antibactérien des composants de l'huile essentielle. Les espèces à thymol sont en effet un peu plus sensibles que celles à carvacrol.

V.2.2. Concentration minimale inhibitrice de *Mentha spicata*

Les souches de *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* ont présenté le même degré de sensibilité vis-à-vis de l'huile de *Mentha spicata* avec des CMI à des concentrations de 10 µl/ml. Selon **Haddouch et al, (2020)**, *Mentha spicata* s'est montrée très efficace contre les bactéries gram positif comme *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* et *Listeria monocytogenes*. Les diamètres des zones d'inhibition varient entre 22 et 40 mm et les valeurs de CMI sont rangées entre 2.5 et 31.6 µg/ml. L'huile est aussi très active contre les bactéries gram négatif comme *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa*, les diamètres des zones d'inhibition varient entre 18 et 24 mm, tandis que les valeurs de CMI vont de 40 à 87,8 µg/ml.

L'ensemble des études montre que la menthe possède un réel potentiel antibactérien. De fortes concentrations de Carvone peuvent l'effet antibactérien de cette huile essentielle et expliquent l'usage traditionnel de cette huile essentielle (*Mentha spicata*) dans le traitement de maladies bactériennes (**Boukhebt, 2011**).

V.2.3. Concentration minimale inhibitrice d'*Eucalyptus globulus*

Dans le cas d'*Eucalyptus globulus*, les résultats ont montré que pour les deux souches testées, cette huile essentielle possède la faible activité antibactérienne par rapport aux autres l'huiles testées.

Les chercheurs croient que les propriétés médicinales de l'eucalyptus sont surtout attribuables à l'eucalyptol (1,8- cinéole) que renferment ses feuilles. C'est pourquoi on s'entend généralement pour dire que, pour être efficace, l'HE doit renfermer 70 à 85 % de cette substance (**Boukhatem et al, 2017**).

L'étude menée par **Bouaoun et al, (2010)**, a révélé que l'activité antimicrobienne de l'eucalyptus est attribué principalement à l'eucalyptol (1,8-cinéole) monoterpène appartenant à la classe des éthers. Il a des propriétés antioxydantes et antibactériennes et donc explique l'origine de l'activité antimicrobienne de cette huile. Ce composé est réputé avoir une grand pouvoir inhibiteur vis-à-vis de certains germes bactériens tels que *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis* (**Boukhatem et al, 2017**).

V.2.4. Détermination de la CIF et de l'indice CFI (ICFI)

Les résultats susmentionnés ont été pris en compte pour la réalisation de la suite des investigations. Par conséquent, nous avons décidé de déterminer les valeurs de la CMI des deux souches afin de déterminer le degré d'efficacité de l'association de l'HE de l'origan ainsi que celle de la menthe vis-à-vis des deux souches étudiées.

Selon l'échelle de lecture proposé par **Odds, (2013)** et **EUCAST, (2000)**, l'association des huiles essentielles d'*Origanum* sp et de *Mentha Spicata* a donné un effet indifférent pour les deux souches étudiées : ICIF=0,625 pour *Escherichia coli* et ICFI=1,0625 pour *Staphylococcus aureus* (Figure 15).

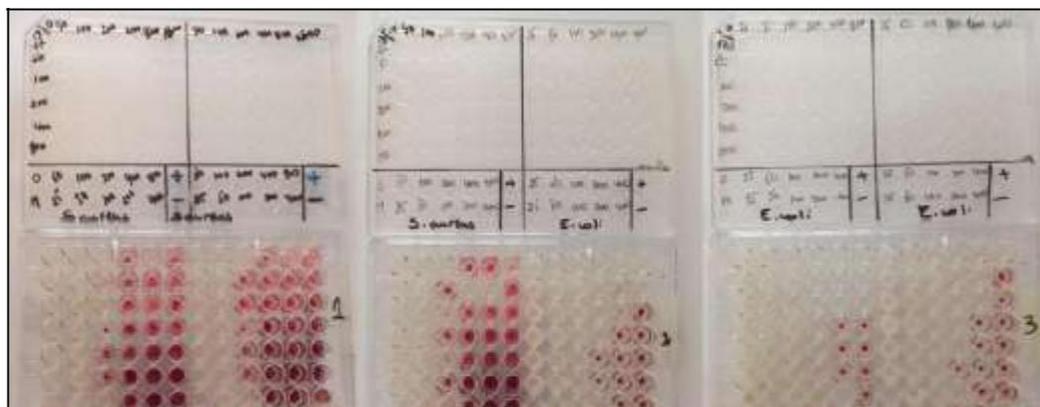


Figure20 : Détermination de la CFI et de l'ICFI

Les résultats obtenus montrent que l'activité de chacune des huiles essentielles n'est pas affectée par la présence de l'autre huile essentielles. Ces résultats sont semblable ceux obtenus

par **Mouhi, (2015)**.

En effet, l'efficacité des associations semble être liée à la composition chimique des HEs combinées et aux interactions possibles entre leur principales composantes (**Goni et al, 2009**) ; et selon **Benmessaoud, (2015)**, l'activité antibactérienne des huiles essentielles est due à l'action synergique ou antagoniste entre plusieurs composants majeurs et mineurs de ces HEs.

De même, toutes les associations ne sont pas synergiques et de plus la synergie n'est pas exclusivement recherchée au cours d'une combinaison, comme par exemple lors de l'élargissement du spectre antibactérien (**et Hidri, 2009**).

Conclusion

Et

Recommandations

Au terme de notre travail, nous pouvons conclure que :

L'étude de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion sur disque montre que l'huile essentielle de l'*Origanum* sp présente une activité très élevée par rapport les deux autres huiles essentielles, à savoir *Eucalyptus globulus* et *Mentha Spicata*.

La détermination de la concentration minimale inhibitrice par la microtitration a montré une activité antibactérienne importante d'huile de l'*Origanum* sp et une bonne activité antibactérienne pour *Eucalyptus globulus*. Cependant, *Mentha spicata* a présenté une faible activité vis-à-vis des 2 souches étudiées.

Nous avons en particulier pu montrer que l'association de l'huile essentielle d'*Origanum* sp et de *Mentha Spicata* a montré un effet indifférent pour les deux souches étudiées.

Cependant, l'association de ces deux huiles permet tenait de réduire le risque des toxicités lié à l'utilisation seul de l'huile essentielle d'*Origanum* sp qualifié comme étant une huile essentielle forte.

Enfin, on peut conclure dire que l'utilisation de ces huiles essentielle reste bénéfique pour le traitement de certains microorganismes pathogènes.

Recommandation

Notre travail fait partie d'un long et important axe de recherche dans le but est de valoriser d'avantage nos ressources locales, notamment l'utilisation des plantes aromatique et médicinal dans plusieurs domaine, parmi lesquels la technologie agro-alimentaire, l'amélioration de la qualité des aliments ainsi que leur conservation. Ces huiles essentielles peuvent aussi être utilisées dans le traitement et la prévention des maladies infectieuse causées par des bactéries pathogènes.

Références

Bibliographiques

Référence bibliographiques

1. **Adli.D.E (2022)**, Chemical composition, in vitro antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of *Mentha spicata* essential oil: A Review, *Phytothérapie* DOI 10.3166/phyto-0311.
2. **Amarti.F , El Ajjouri .M, Ghanmi .M , Satrani.B ,Aafi.A , FARAH.A , Khia.A,Guedira.A , Rahouti.M et Chaouch.A (2011)**, Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydant de l'huile essentielle de *Thymus zygis* du Maroc, Article original pharmacologie, aromathérapie, phytothérapie , Springer-Verlag France.
3. **Anton.R et Annelise.L (2005)**, Plantes aromatiques: épices, aromates, condiments et huiles essentielles, Lavoisier, édition Tec &Doc.
4. **Bekka.F (2009)**, Effet des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum Desf.* et d'*artemisia herba alba Asso.* sur des bactéries multirésistantes, mémoire de magister, Université Abderrahmane Mira de Bejaia.
5. **Ben Salha.G (2020)**, Déterpénation de l'huile essentielle d'*Organum Majorana L.* et évaluation des activités biologiques, thèse de Doctorat en cotutelle, Université de Tunis El Manar.
6. **Benbouabdeah. S, Ziane. D (2015)**, Prévalence de souches de *Staphylococcus aureus* dans le lait cru et les produits laitiers artisanaux, université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, département de biochimie et microbiologie.
7. **Benkherara.S, Bordjiba.Ou, Boutlelis.A (2011)**, Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de la Sauge officinale : *Salvia officinalis L.* sur quelques entérobactéries pathogènes, Laboratoire de biologie végétale et environnement, faculté

- des sciences, département de biologie, université Badji Mokhtar, Revue Synthèse N°23.
8. **Benmessaouda.A, Chabane.CH.F (2015)**, Activité antibactérienne des huiles essentielles de *Thymus fontanessi*, de *Mentha spicata* et de *Mentha pulegium* sur deux souches de *Pseudomonas*. Application sur la soupe de poisson, université de Mouloud Mammeri faculté des sciences biologiques et sciences agronomiques.
 9. **Bergey (1994)**, Bergey's Manual of determinative bacteriology, de 9^{ème} Edition.
 10. **Bergy's.M (2007)**, of systematic Bacteriology 2nd Edition.
 11. **Biljana.D (2011)**, Antimicrobial effect of essential oil isolated from *Eucalyptus globulus Labill.* from Montenegro, Vol.29, No. 3: 277–284.
 12. **Boukhatem.M, Ferhat.M.A, Kameli.A et Mekarnia.M (2017)**, *Eucalyptus globulus Labill* : un arbre à essence aux mille vertus *Eucalyptus globulus Labill*: a perfume tree with several medicinal purposes, Phytothérapie DOI 10.1007/s10298-017-1114- 3. Lavoisier SAS, page1-2.
 13. **Boukhebti.H, Chaker.AN, Belhadj.H, Sahli.F, Ramdhani.M, Laouer.H et Harzallah.D (2011)**, Chemical composition and antibacterial activity of *Mentha pulegium L.* and *Mentha spicata L.* essential oils, Der Pharmacie Lettre 3, 4, p267-275.
 14. **Boussena.S (2019)**, Manuel des travaux pratiques de bactériologie, institut des sciences vétérinaires département de productions animal .
 15. **Brahmi.F (2016)**, Etude phytochimique et activités biologiques de quelque espèces du genre *Mentha* : cas de *M. spicata L.*, *M.puleguim L.* et *M.rotundifolia L.* huds. thèse doctorat, université Abderrahmane Mira Bejaia, page 31-32.
 16. **Bruneton (1993)**, pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 2^{ème}.ed.
 17. **Bruneton j(2009)**, pharmacognosie, phytochimie, plante médicinales (4^{ème}.ed),

- p571.
18. **Burt.S (2004)**, Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94: 223-253.
 19. **Carneiro de Barros.J, Conceicao.M, Gomes Neto.N, Veirai da Costaa, Siqueira.J, Diniz.I, Leite de Souza.E. (2008)**, Interference of *Origanum vulgare L.* essential oil on the growth and some physiological characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. *Food Science and Technology* 42.Pp. 1139- 1143.
 20. **Carnesecchi.S, Schneider. Y, Ceraline.J, Duranton.B, Gosse.F, Seiler.N et Raul.F (2001)**, Geraniol, a component of plant essential oils, inhibits growth and polyamine biosynthesis in human colon cancer cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298 (1): 197- 200.
 21. **Cecilia M. A (2008)**, federation of european microbiological societies published by blackwell publishing ltd.all rights reserved, uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic *E. Coli*.
 22. **Chabane.S, Siad.F, Baazizi.H (2015)**, L'effet bio-insecticide de l'huile essentielle de l'origan *Origanum vulgare (Lamiaceae)* vis-à-vis de deux espèces d'insectes ravageurs le charançon *Sylophilus oryzae (Coleoptera)* et le thrips *Frankliniella occidentalis (Thysanoptera)*, mémoire de master.
 23. **Changriha.N, Cherir .A et Baailouamer.B.Y (1998)**, article activité antimicrobienne des huiles essentielles de cypres et d'eucalyptuse algériens *rivista italiana eppos venticinquesimo numero- agosto 98*, laboratoire d'analyse organique fonctionnelle, Institut de chimie, université des sciences et de la technologie Houari Boumediene.
 24. **Chebaibi.A (2015)**, Evaluation du pouvoir antimicrobienne des huiles essentielles de sept plantes médicinales récolte au Maroc. Article phytothérapie ,Lavoisier SAS
 25. **Chikoune.A (2007)**, Huiles essentielles de thym et d'origan étude de la composition chimique, de l'activité antioxydant et antimicrobienne, diplôme de magister en agronomie.

26. **Chloé.F, Justine.M et Théo.B(2014)**, la distillation, lycée jacques de vaucanson, premier scientifique 624.
27. **Claire.L (2006)**, ARN régulateurs de *Staphylococcus aureus* : Rôle de RsaA dans la formation du biofilm et de la capsule, niveaux d'expression des ARN dans les prélèvements cliniques, diplôme de doctorat.
28. **Cohen.D (2013)**, les huiles essentielles à l'officier : danger pour la femme enceinte et le nouveau-né, faculté pharmacie de Grenoble université Joseph Fourier.
29. **Corne.P (2004)**, *Staphylococcus aureus* dans un service de réanimation : étude génétique, phénotypique et épidémiologique. thèse, Montpellier 1.
30. **Cronquist.A (1981)**, An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University.Press.Newyork.1262P.
31. **Daniel.F (2014)**, Ma Bible des huiles essentielle, page15.
32. **Debuigne.G et Couplan.F (2019)**, le petite Larousse des plantes médicinales, page126.
33. **Degryse.A.C, Delpia.L et Voinier.M.A (2008)**, atelier santé environnement, risques et bénéfices possible des huiles essentielles, page 94.
34. **Denes.E, Hidri.N (2009)**, Synergie et antagonisme en antibiothérapie
Antibiotic synergy and antagonism, 11, 106—115.
35. **Devlynne S.O(2018)**, *Staphylococcus aureus* pediatrics in Review vol 39 No.6.
36. **Douay.S (2009)**, L3 SVB-Monografiade la *menthe verte*-fiche systématique des angiospermes. L3SV.
37. **Douhan.H (2021)**, les infections à entérobactéries, épidémiologie et diagnostic bactériologique, thèse de docteur en pharmacie.
38. **Edition. A.S.N (2012)**, CLSI document M07-A9. Wayne. *Clinical and*

- Laboratory Standards Institute*. (USA). 32(2). 18-20.
39. **Federighi.M (2005)**, Bactériologie alimentaire 2^{ème} édition. Page 28.
40. **Filippo.F, Simone.M, Barbara.T, Elisabetta.F, Luisa.P, Giulia.G, Domenico.C (2017)**, A novel interpretation of the Fractional Inhibitory Concentration Index: the case *Origanum vulgare L.* and *Leptospermum scoparium J. R. et G. Forst* essential oils against *Staphylococcus aureus* strains, journal homepage, 95 (2017) 11–17
41. **Flandrois.J.P (1997)**, Bactériologie médicale, page 174.
42. **Fontanay.S (2015)**, Evaluation des activités antibactériennes des huiles essentielles et/ ou de leurs composants majoritaires, Hegel Vol.5N2.
43. **Goni.P, Lopez.P, Sàncnez.C, Gomez-Lus.R et Becerril.R, Nerin.C, (2009)**, d clove essentieles oil.food chime, 116(4):982-989antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon an.
44. **Grosjean.N(2015)**, Les huiles essentielle se soigner par l’aromathérapie, page 23.
45. **Hadouch.D et Nourine.N et Begacem.Ch (2020)**, Etude de l'activité antimicrobienne de l’huile essentielle de *Mentha spicata* de la région d’Ain Defla, mémoire de fin d’étude université Djilali Bounaama Khemis Miliana.
46. **Himed (2011)**, Evaluation de l’activité antioxydante des huiles essentielles de *Citrus limon* : application à la margarine. mémoire de magister. université Mentouri Constantine, Algérie. Page 91.
47. **Idder.M.A, Idder-Ihil.H, Chakou.M et Bassou.K (2009)**, Séminaire international, Efficacité antibactérienne et antifongique des huiles essentiels obtenues par extraction de la menthe verte *Mentha spicata L.*- Issue de la region de Ouargla sur quelques germes pathogènes: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *Candida albicans*.
48. **Jean-Loup.A, Henry.D, Francois.D et Henri.M (1997)**, Bactériologie clinique, 2^{ème} édition, page 152.

49. **Kessler.R et al (2015)**, Diarrhea, bacteremia and multiorgan dysfunction due to an extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strain with enteropathogenic *E. coli* genes, FEMS pathogens and disease, Vol.73, No.8.
50. **Kintzios Spiridon.E (2002)**, Origano: The genera *Origanum* and *Lippia* (medicinal and aromatic plants – industrial profiles) – Taylor & Francis.
51. **Koziol.N (2015)**, Huiles essentielles d'*Eucalyptus globules*, d'*Eucalyptus radiata* et de *Gorymbia Citriodra* : qualité efficacité et toxicité, diplôme d'état de docteur en pharmacie, université de Lorraine.
52. **Lakhdar.L (2015)**, Evaluation de l'activité antibactérienne d'huiles essentielle sur *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* Etude in vitro, faculté de Médecine Dontaire de Rabat.
53. **Lewis.F et Ausubel.M(2006)**, Prospective for plant derived antibacterials, national biotechnology 24 :15 04_1507.
54. **Meyer.B (1984)**, Warnod perfumer and flavorist natural essential extraction processes and application to same major oil,1984.9.93,p103.
55. **Mnayer.D (2014)**, Ingénieur Agronome, Eco-extraction des huiles essentielles et des arômes alimentaires en vue d'une application comme agents antioxydants et antimicrobien, thèse doctorat, académie d'Aix –Marseille université d'vignon et des pays de Vaucluse.
56. **Moro Bronzo.A(2009)**, Grand guide des huiles essentielle santé beauté. Bien être, page22-23.
57. **Mouas (2017)**, Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique du *romarin rosmarinus officinalis*, Revue agrobiologia 7(1) :363-370.

58. **Mouhi.L (2015)**, étude des activités biologique de l'association des huiles essentielles de plantes de la flore algérienne. Elaboration d'une forme pharmaceutique, université des sciences et de la technologie Houari Boumediene, faculté de génie mécanique et génie des procédés
59. **Mouhi.L(2017)**, étude des activités biologique de l'association des huiles essentielles de plants de la flore algérienne. elaboration d'une forme pharmaceutique, thèse de doctorat 3ème cycle.
60. **Nisha.V.P et Michael P.D(1992)**, *Escherichia coli* O157 :H7 : Epidemiology, Pathogenesis, and methods for detection in food, journal of food protection, Vol.55, No. 7 pages 555-565.
61. **Oba Samoussa.M, Abdellaoui.A et Kettani.A, Saile.R et Bennani.H (2018)**, Etude de la sensibilité aux huiles essentielles de *Cinnamomim Verum*, *Eucalyptus Globulus*, et *Glycyrrhiza Glabra L* ainsi qu'aux antibiotiques de certains germes issus de la restauration collective, european scientific journal édition Vol.14.No.3ISSN :1857-7881.
62. **Ouis.N (2015)**, Etudes chimique et biologique des huiles essentielles de *coriandre de fenouil* et de *persil*, thèse de doctorat, faculté de sciences exactes et appliquées d'Oran. P5, 11,12.
63. **Paulin.C (2015)**, *Mentha spicata* : description et utilisation en thérapeutique et en agriculture en thérapeutique comme antigerminatif sur la pomme de terre, université de Picardie jules, thèse de diplôme d'état de docteur en pharmacie.
64. **Pierron.Ch(2015)**, Les huiles essentielles et leur expérimentation dans les services, hospitalières de France : exemple d'applications en gériatrie-gérontologie et soins palliatifs, thèse de doctorat, université de Lorraine.
65. **Ponce.A.G, Fritz.R, del valle.C.et Roura.S.I (2003)**, Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic swiss chard, lebensm.-wiss.u.-technol.36, 679-684p.

66. **Raut J-sand Karuppayil S.M (2014)**, A status review on the medicinal properties of essential oils. industrial crops and products.
67. **Sallé.J (1991)**, Les huiles essentielles : synthèse d'aromathérapie et introduction à la sympathicothérapie. Paris : Frison-Roche.
68. **Sari.M (2011)**, étude biologique et phytochimique de l'origan (*origanum vulgare L. ssp glandulosum* (Desf.) Letswaart) espece endermique d'Algerie – Tunisie, doctorat, université Ferhat Abbas-Setif faculté des science département de biologie.
69. **Seringe.M, Talla.M, El Hadji.B, Abdoulaye.T, Papa Seyni.C, Cheikhna.H et Marie-Laure.F(2021)**, Activités antioxydante et insecticide d'huiles essentielles de *Mentha arvensis L.* du Sénégal, nt. J. Biol. Chem. Sci. 15(3): 966-975, June 2021.
70. **Souza.E, Barros.J.C, d'Oliveira.C.E et Conceicao M (2010)**, Influence of *Origanum vulgare L.* essential oil on enterotoxin production, membrane permeability and surface characteristics of *Staphylococcus aureus*. International journal of food microbiology. 137. Pp. 308-311.
71. **Tapes. B, Sumanta. B(1994)**, Determination of spécificités of rabbit anisera against the O-antigenic polysaccharide from *Escherichia coli* O126, FEMS Immunology and medical microbiology 10 (1994) 19-24 1994 Federation of european microbiological societies 0928-8244/94/\$07.00 published by elsevier.
72. **Toure.D (2015)**, Etudes chimique et biologique des huiles essentielle de quatre plantes aromatiques médicinales de côte d'ivoire, thèse de doctorat Cote d'Ivoire, université Félix Houphouët-Boigny.
73. **Wertheim.H.F (2005)**, The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections.lancet infectious diseases, 5(12) : pages 751-762.
74. **Yves.L, Florence.B and Gautier.M (2003)**, *Staphylococcus aureus* and food poisoning, Genetics and molecular research 2(1) :63-76, pages 66.

Annexes

Annexe 1 Les milieux cultures

Gélose Muller Hinton : c' est un milieu destiné à la réalisation d' antibiogramme par diffusion

Composition :

Formule théorique en g/l d' eau purifiée :

Peptones de viande Bovin 2g2g

Peptones de caséine Bovin 17.5g

Fécule de pomme de terre amidon 1.5g 1.5g

Lon Ca⁺⁺45 à 75mg/l 75mg/l

Lon Mg⁺⁺ 20 à 35 mg/l

Agar 17g 17g

Principe :

Sa faible teneur en thymine-thymidine (élément inhibiteur de l' activité des sulfamides) diminue les phénomènes de repousse autour des disques et permet une meilleure détermination des diamètre d' inhibitions.

Préparation :

-Mettre 38g de poudre en suspension dans un litre d' eau purifiée, bien mélanger.

-Chauffer sous agitation et laisser bouillir pendant 1 minute.

-Autoclaver à 118 °C pendant 15 minutes.

Gélose Mannitol-sel

Composition :

Digestion pancréatique de caséine58g, digestion peptique de testicule animale 5.8g, extrait de bœuf 10g, D-Mannitol 108g, Chlorure de sodium 75.8g, Agar 150 rouge de phénol 0.025g.

PH 7.4 ± 0.2 à 25°C

Préparation :

- Suspendre 111 g dans 1 l d' eau distillée
- Chauffer jusqu' à la dissolution totale
- Autoclaver à 121°C pendant 15 minutes

Gélose Mac Conkey

La gélose Mac Conkey est un milieu d' isolement ordinaire, lactose et sélectif des bacilles à Gram négatif non exigeants.

Composition :

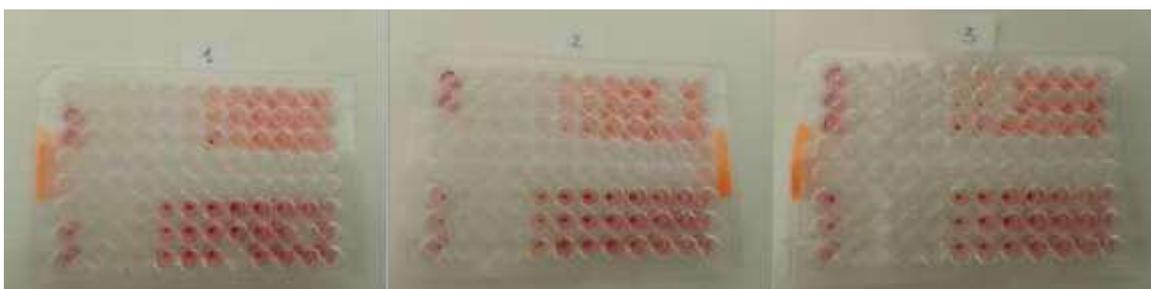
Peptone 20.0g, Sels biliaires n 3 1.0g, Cristal violet 0.001g, lactose 10.0g, Rouge neutre 0.05g, Chlorure de sodium 5.0g, Agar 15.0g.

PH=7.1

Annexe 2 Les huiles essentielles



Annexe 3 les résultats de CMI



Résumé

L'objectif du présent travail est l'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Origanum* sp, d'*Eucalyptus globulus*, et de *Mentha spicata* vis-à-vis de 2 souches bactériennes : *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*.

La détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par la technique de microdilution nous a permis de quantifier l'activité antibactérienne de ces huiles essentielles vis-à-vis des souches testées.

L'huile essentielle de l'origan a exhibée une très bonne activité antibactérienne avec des CMI de 5 µl/ml pour *Staphylococcus aureus* et 10µl/ml pour *Escherichia coli*, suivie par l'huile essentielle de la menthe avec des CMI de 10µl/ml pour *Staphylococcus aureus* et pour *Escherichia coli*, et en fin de l'eucalyptus avec des CMI de 5µl/ml pour *staphylococcus aureus* et 100µl/ml pour *Escherichia coli*.

L'association des huiles essentielles de l'origan et de la menthe a donné un effet indifférent avec un Indice de Concentration Inhibitrice Fractionnaire (ICIF) de 1,0625 et de 0,625 pour *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*, respectivement.

Même si les ICIF ne sont pas en faveur de l'association des 2 huiles testées, cependant, l'association entre ces deux huiles permet de réduire la concentration des huiles essentielles et pourrait réduire la toxicité de l'huile essentielle de l'origan, si utilisée toute seule.

Mots clés : Huiles essentielles, activité antibactérienne, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Eucalyptus globulus*, *Mentha spicata*, *Origanum* sp.

ملخص

الهدف من هذا العمل هو تقييم النشاط المضاد للبكتيريا للزيوت الاساسية من الزعتر البري *Origanum Sp* و الكاليتوس *Eucalyptus globulus* والنعناع الاخضر *Mentha spicata* ضد سلالتين بكتيريتين المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* و الاشريكية القولونية *Escherichia coli*.
سمح لنا تحديد الحد الأدنى من التركيز المثبط CMI لتقنية التخفيف الدقيق بتحديد النشاط المضاد للبكتيريا لهذه الزيوت الاساسية ضد السلالات المختبرة .

أظهر الزيت العطري للزعتر نشاطا مضادا للبكتيريا جيدا جدا بقيمة 5ميكرو لتر/مل للمكورات العنقودية الذهبية و10ميكرو لتر/مل للاشريكية القولونية متبوعا بزيت النعناع الأساسي بقيمة 10ميكرو لتر/مل للمكورات العنقودية الذهبية و الاشريكية القولونية وأخيرا الكاليتوس بقيمة 5 ميكرو لتر/مل للمكورات العنقودية الذهبية و 100ميكرو لتر/مل للاشريكية القولونية.
مزيج من الزيوت العطرية من الزعتر والنعناع أعطى تأثير غير مبال مع معامل تركيز مثبط جزئي CFI بقيمة 0.625 و0625.1 للمكورات العنقودية الذهبية و الاشريكية القولونية على التوالي .
حتى ان كانت اللجنة الدولية للأمم المتحدة الرابعة لا تؤيد الجمع بين الزيتين المختبرين، فان الارتباط بين هذين الزيتين يمكن أن يقلل من سمية الزيت العطري للزعتر المستخدم بمفرده.

الكلمات المفتاحية: الزيوت الأساسية, النشاط المضاد للبكتيريا, الاشريكية القولونية, المكورات العنقودية الذهبية, الكاليتوس, النعناع الأخضر الزعتر البري.

Abstract

The objective of the present study was the evaluation of the antibacterial activity of essential oils of *Origanum Sp*, *Eucalyptus Globulus*, and *Mentha Spicata* toward 2 bacterial strains: *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

The determination of the minimum inhibitory concentration (CMI) by the technique of micro dilution allowed us to quantify the antibacterial activity of these essential oils towards the tested strains.

The essential oil of the oregano exhibited a very good antibacterial activity with CMIs of 5µl/ml for *Staphylococcus aureus* and 10 µl/ml for *Escherichia coli*, followed by the essential oil of mint with 10µl/ml CMI for *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, and at the end of the *Eucalyptus globulus* with 5µl/ml CMIs for *Staphylococcus aureus* and 100 µl/ml for *Escherichia coli*.

The association of essential oils of oregano and mint has given an indifferent effect with an Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) of 1,0625 and 0,625 for *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, respectively. Although FICIs were not in favor of the combination of the 2 tested essential oils, however, the association between these two oils could reduce the toxicity of the essential oil of the oregano, when used alone.

Keywords: Essential oils, Antibacterial activity, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Eucalyptus globulus*, *Mentha spicata*, *Origanum sp*.