

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministre de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
Université MOULOUD MAMMERI de TIZI OUZOU
Faculté des sciences biologiques et des sciences agronomiques
Département des sciences biologiques



*En vue de l'obtention du diplôme de Master académique en Biologie
Option Microbiologie Appliquée*

Memoire de fin d'étude

Thème :

*Etude in vitro du pouvoir antimicrobien de quelques
substances d'origine végétale, animale et synthétique testées
individuellement et en association*

Réalisé par :

ADKHIS Aghiles
LAMRANI Hayet

Dirigé par :

Dr AMROUCHE T.

Devant les jurés :

Président : M^r SADOUDI R. Maitre de conférences B .UMMTO

Examinatrice : M^{lle} BEN AHMED DJILALI A. Maitre de conférences B.UMMTO

Examinatrice : M^{me} Hellal Z. Maitre assistante A.UMMTO

PROMOTION
2014-2015

Remerciements

Nous tenons tout à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail;

En second lieu, nous tenons à remercier notre encadreur D' Amrouche T., maitre de conférences à l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, pour ses conseils judicieux, son jugement critique et son appui tout au long de cette étude. Votre sérieux, votre compétence et votre sens du devoir m'ont énormément marqués. Ce travail est pour nous est l'occasion de vous témoigner notre profonde gratitude.

Nos remerciements s'adressent également au Pr Adkhis et Mme Beradj de nous avoir procuré les complexes chimiques utilisés dans cette études.

Nous tenons à remercier le président du jury pour le grand honneur de présider le jury et les examinateurs d'avoir bien voulu examiner ce travail.

Enfin, nous ne pouvons oublier de remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

Dédicace

*A mes chers parents qui m'ont donné toute les belles choses:
existence, amour, tendresse, confiance, qui ont partagé avec moi
toutes mes instants de joie et de tristesse, qui m'ont soutenue
dans toutes les circonstances de ma vie, qui m'ont toujours
épaulé, aidé, orienté vers les bons sens.*

A mes frères et sœurs : Kahina , Roza et Chrif

A mes amies et amis : Marzak, Kader et Mohamed

A mes neveux : Amine, Kyrian et Louna

A toute la promotion microbiologie appliquée 2014-2015

*Et a toutes personne ayant contribué de près ou de loin pour ce
travail*

Aghils

Sommaire

Résumé	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction générale	01

Partie I: Bibliographie

Chapitre I : Les agents antimicrobiens

1- Définition d'un agent antimicrobien	03
2- Agents antimicrobiens d'origine végétale	03
2-1- les huiles essentielles	03
2-2- Les polyphénols	07
2-3- Huile essentielle de <i>Thymus Vulgaris</i>	09
3- Agents antimicrobiens d'origine animale	11
1-3-1- La chitine	11
1-3-2- Le chitosane	11
4- Agents antimicrobiens d'origine microbienne	15
4-1-Bactériocines	15
4-2- Les acides organiques	16
5- Agents antimicrobiens d'origine microbienne ou synthétique.....	17
6- Agents antimicrobien d'origine synthétique	18
6-1- Les complexes chimiques	18
6-2- Les antiseptiques et les désinfectants.....	20

CHAPITRE II : MODE D’ACTION DES AGENTS ANTIMICROBIENS

1- Activité antimicrobienne des huiles essentielles.....	22
1-2- Activité liée à la composition chimique	22
1-3- Activité liée au type de microorganismes.....	22
1-4- Méthodes d’évaluation de l’activité antimicrobienne	23
1-5- Mécanismes d’action des huiles essentielle	23
1-6- Mécanisme d’action du Thym	25
1-7-Synergies entre les composants d’une huile essentielle.....	25
2- Mécanisme d’action des bactériocines	27
3- Mécanismes d’action du chitosane.....	28
4- Activités biologiques des complexes	29
4-1- Activité antimicrobienne des complexes	30
4-2- Mécanismes d’action des complexes.....	30
5- Mécanismes d’action des acides organiques	31
6- Mode d’action des antibiotiques.....	33
6-1- Antibiotiques agissant au niveau de la paroi bactérienne	33
6-2- Antibiotiques agissant sur les membranes	33
6-3- Antibiotique inhibant la synthèse protéique	33
6-4- Antibiotique se fixant sur la sous unité 50s du ribosome	33
6-5- Antibiotiques agissant sur les acides nucléiques	34

CHAPITRE III : DOMAINES D’UTILISATION

1-Application industrielle des huiles essentielles	35
1-1-Application en industrie alimentaire	35
1-2-Application des HE dans la désinfection des locaux	36
1-3-Application des HE en cosmétiques.....	37
1-4-Utilisation pharmaco-thérapeutique	37
1-5-Toxicité des huiles essentielles	38
2-Applications du chitosane	39
2-1-Application dans le domaine alimentaire.....	39
2-2-Application dans le traitement des eaux	39
3-Application industrielle de l’acide citrique	40
3-1-Industrie alimentaire	40
3-2-Industrie pharmaceutique	40
4-Comparaison entre deux agents antimicrobiens de substitution	41

Partie II Etude expérimentale

1- Matériel	42
1-1-Souches étudiées	42
1-2- Milieux de cultures solides	42
1-3- Solution et tampon	42
1-4- Disque d'antibiotiques	43
1-5- Huile essentielle utilisé	43
2- Méthodes	44
2-1- Lieu d'étude	44
2-2- Vérification de la pureté des souches	45
2-3- Conservation des souches	45
2-4- Etude macroscopique	45
2-5- Etude microscopique.....	45
2-6- Coloration de Gram.....	45
2-7- Préparation des solutions	46
2-7-1- Préparation des complexes chimiques	46
2-7-2- Préparation du chitosane.....	48
2-7-3- Dilution de l'huile essentielle de thym	48
2-7-4- Préparation des solutions d'acide citrique	48
2-8- Test de l'activité antimicrobienne des agents antimicrobiens	48
2-8-1- Méthode des disques.....	48
2-8-2- Méthode des Puits.....	48
2-8-3- Méthode des spots.....	49
2-8-3-1- Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI), bactéricide (CMB) et fongicide (CMF).....	50
2-9-Association des agents antimicrobiens	50

Parti III Résultats et discussion

1- Vérification des souches de référence	51
2- Evaluation de l'activité antimicrobienne et antifongique.....	51
2-1- Effet du DMSO sur les souches testées	52
2-2-Effet de l'huile essentielle <i>Thymus vulgaris</i> sur les différentes souches	52
2-3- Effet de l'acide citrique sur les souches microbiennes	57
2-4- Effet du complexe chimique sur les différentes souches microbiennes.....	59
2-5- Effet de chitosane sur les différentes souches microbiennes	63
3- Détermination de la concentration minimale inhibitrice	66
4 - Détermination de la CMI des différents agents antimicrobiens	68
5- Effet de la combinaison des agents antimicrobiens.....	70
5-1- Effet de la combinaison acide citrique et complexe chimique.....	70
5-2-Effet combiné de l'huile de thym et l'acide citrique.....	71
5-3- Effets de l'huile de thym et de l'acide citrique sur <i>E .Coli</i>	73
5-4- Effets de l'huile de thym et de l'acide citrique sur <i>Candida albicans</i>	74
Conclusion	77

Résumé

L'étude que nous avons effectuée *in vitro* avait pour objectif d'évaluer l'activité antimicrobienne de quelques agents antimicrobiens d'origine végétale, animale ou synthétique (huile essentielle, chitosane, acide citrique et complexes chimiques). L'évaluation a été effectuée par la méthode des puits, alors que les concentrations minimales inhibitrices ont été déterminées par la méthode des spots en surface sur un milieu gélosé. En dernier lieu, des combinaisons de quelques agents antimicrobiens (huile essentielle /complexe chimiques et huile essentielle/acide citrique) ont été testées par la méthode des puits.

Les résultats obtenus ont montré que l'huile essentielle de thym avait un pouvoir antibactérien et antifongique de loin supérieur à celui des autres agents testés. Le chitosane et l'acide citrique ont montré un effet inhibiteur intermédiaire, alors que les complexes chimiques se sont avérés plus ou moins efficaces. Le test de combinaison réalisé a mis en évidence une interaction positive (effet additionnel) entre l'huile essentielle de thym et l'acide citrique.

Enfin, nos résultats laissent à suggérer une possible application des combinaisons d'agents antimicrobiens naturels dans les domaines alimentaires, pharmaceutiques ou cosmétiques.

Abstract

The study we performed *in vitro* was to evaluate the antimicrobial activity of some antimicrobial agents of vegetable, animal or synthetic (essential oil, chitosan, citric acid and chemical complexes).The evaluation was done by the method of the wells, while the minimum inhibitory concentrations were determined by the method of surface spots on an agar medium. Finally, combinations of some antimicrobial agents(essential oil / chemical complex and essential oil /citric acid) were tested by the wells method.

The results obtained showed that the essential oil of thyme antibacterial and antifungal had power far superior to other tested agents. Chitosan and citric acid showed an intermediate inhibitory effect; where as the chemical complexes were more or less effective. Realized test combination showed positive interaction (additive effect) between the essential oil of thyme and citric acid.

Finally, our results suggest a possible application of natural antimicrobial agents combinations in food, pharmaceutical or cosmetic.

Liste des figures

Figure 01: Structure du précurseur des HE : l'isoprène.....	04
Figure 02: Morphologie générale de la plante <i>T.vulgaris</i>	09
Figure 03 : Structure chimique du thymol et du carvacrol.....	11
Figure 04: Structure De La Chitine (A), Du Chitosane (B) Et De La Cellulose.....	12
Figure 05: Procédé de la fabrication de chitine et chitosane.....	14
Figure 06: Structure chimique de l'acide citrique.....	17
Figure 07: Structure de la dimethylglyoxime (Hdmg)	19
Figure 08: Structure général d'un acide aminé	20
Figure 09: Sites d'action des HE's sur la cellule bactérienne	25
Figure 10: Mode d'action des bactériocines de bactéries lactiques	28
Figure 11: Mécanismes d'action des agents majeurs chimio thérapeutiques antibactériens	34
Figure 12: Image montre l'effet de DMSO sur la bactérie (<i>Bacillus cereus</i>)	52
Figure 13: Représentation graphique de l'effet de l'huile de <i>T.vulgaris</i> sur les souches	53
Figure 14: Photos montrant les zones d'inhibition bactérienne avec l'huile de thym	54
Figure 15: Représentation graphique de l'effet de l'acide citrique sur les souches testées ...	57
Figure 16: Représentation graphique de l'effet des complexes chimiques	59
Figure 17 : Photos illustrant l'effet des antibiotiques sur les deux souches bactériennes.....	60
Figure 18 : Photos illustrant l'effet des ligands testées individuellement	61
Figure 19: Photos montrant les zones d'inhibition produites par les complexes chimiques....	62
Figure 20 : Représentation graphique de l'effet du chitosane DDA	63
Figure 21 : Résultat du test des spots de la CMI de l'HE de Thym sur <i>B.cereus</i>	67
Figure 22 : Résultat du test des spots de la CMI du chitosane desacétylé sur <i>E.coli</i>	67
Figure 23 : Photo montre la CMB de chitosane sur les souches bactériennes	68
Figure 24 : Photo illustrant l'effet du complexe n°6 et l'acide citrique sur <i>E.coli</i>	71
Figure 25 : Photos illustrant l'effet du complexe n°3 et l'acide citrique sur <i>B.cereus</i>	71
Figure 26: Photos illustrant l'effet de l'acide citrique et l'huile de <i>T. vulgaris</i> sur <i>B. cereus</i> ..	72
Figure 27 : Photo illustrant l'effet d'huile de thym et de l'acide citrique sur <i>E. coli</i>	74

Liste des tableaux

Tableau 01: Les principaux constituants des huiles essentielles à activité antibactérienne	06
Tableau 02: Quelques composés phénoliques	08
Tableau 03: Classification botanique du <i>Thymus vulgaris</i>	10
Tableau 04: Sources potentielles de la chitine	12
Tableau 05: Classification des principales familles d'antibiotiques	18
Tableau 06: pH minimum de quelques microorganismes.....	32
Tableau 07: Différentes application du chitosane	40
Tableau 08: Avantages et inconvénients industriels de deux agents	41
Tableau 09: Présentation des antibiotiques utilisés en disque	43
Tableau 10: Les différents complexes à base d'acide aminé et de métaux de transition.....	46
Tableau 11: Les dilutions effectuées de l'huile de Thym dans le DMSO	47
Tableau 12: Les concentrations d'acide citrique préparées	47
Tableau 13: Résultats des observations microscopiques de <i>E. coli</i> et <i>B. cereus</i>	51
Tableau 14: Résultats des observations microscopiques de <i>C. albicans</i> et <i>A. niger</i>	51
Tableau 15: Résultats de la CMI des différentes souches microbiennes testées.....	66
Tableau 16: Résultats de la CMB des différentes souches microbiennes.....	68
Tableau 17: Diamètre des zones d'inhibition produites par l'acide citrique avec le complexe chimique n°03 sur <i>E. coli</i>	70
Tableau 18: Diamètre des zones d'inhibition produites par le mélange acide citrique à différentes concentration avec le complexe chimique n°6 sur <i>B.cereus</i>	70
Tableau 19: Résultats des interactions entre les deux agents antimicrobiens (l'huile de thym et l'acide citrique) sur <i>B.Cereus</i>	72
Tableau 20: Résultats des interactions entre deux agents antimicrobiens (l'huile de thym et l'acide citrique) sur <i>E. Coli</i>	73
Tableau 21: Résultats des interactions entre deux agents antimicrobiens (l'huile de thym et l'acide citrique) sur <i>C. albicans</i>	74

Liste des abréviations

AFNOR : Agence française de normalisation

C : carbone

Co : cobalt

°C : degree Celcius

Cu : cuivre

DDA : Degré de désacétylation

DMSO: Diméthyl sulfoxyde.

DO: Densité optique

Hdmg : Dimethylglioxime

He: Huile Essentielle

Ni: nikel

Introduction générale

Introduction générale

La sécurité des aliments est une préoccupation majeure non seulement des pouvoirs publics mais aussi du consommateur soucieux de sa santé. En effet, les risques liés à la contamination et la détérioration des produits alimentaires par les micro-organismes nuisibles est un problème qui n'est pas encore sous contrôle total malgré la disponibilité de techniques de conservation fiables (réfrigération, pasteurisation, etc.).

Outre l'industrie alimentaire, en milieu hospitalier, des bactéries et des champignons pathogènes ont développé des systèmes de défense contre les agents antimicrobiens et une résistance aux nouveaux médicaments.

Pour prévenir les risques liés au développement de microorganismes pathogènes des agents antimicrobiens d'origine naturelle ou synthétiques sont utilisés dans les industries alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques. Cependant, l'apparition de souches microbiennes mutantes (résistantes) et les effets indésirables sur la santé ont montré les limites d'utilisation de certains agents antimicrobiens. De ce fait, la recherche de nouveaux agents antibactériens est devenue plus qu'indispensable et la seule alternative possible pour y remédier efficacement. Pour être innovants et contourner les mécanismes de résistance bactériens, les molécules de demain devront viser de nouvelles « cibles » d'action chez les bactéries. Les pistes de recherche sont nombreuses, mais l'exploration des ressources naturelles apparaît comme des plus prometteuses car celles-ci constituent, de par leur biodiversité, la plus grande réserve de substances actives naturelle. Des substances issues du métabolisme de microorganismes (métabolites microbiens) tels que les bactériocines et les acides organiques peuvent être utilisées afin de maîtriser le développement de microorganismes indésirables. En outre, des études ont montré l'intérêt dans la bio préservation de molécules issues de végétaux telles que les huiles essentielles qui exercent une activité antimicrobienne contre différentes espèces (ADEBAYO *ET AL.*, 2010; NAGENDRA *et al.*, 2010).

Des études récentes ont démontré que l'association d'agents antimicrobiens permet de réduire sensiblement la concentration des agents antimicrobiens, ceci constitue donc un grand avantage pour remédier au problème de résistance bactérienne et les effets secondaires indésirables des agents antimicrobiens, ainsi que les coûts.

Cependant, trop peu d'études ont été consacrées aux associations d'agents antimicrobiens pouvant avoir des interactions positives se traduisant par un effet synergique ou additionnel. Pourtant, l'intérêt de l'association des agents antimicrobiens est tout particulier dans le

Introduction générale

domaine médical, sachant que les associations ont pour but de réduire la quantité d'agent antimicrobien afin d'éviter toute adaptation des microorganismes. En devenant insensibles à tout traitement, ces bactéries limitent la gamme d'antibiotiques disponibles en thérapeutique médicale. La situation est d'autant plus alarmante que les infections causées par les bactéries résistantes entraînent souvent une prolongation de l'état pathologique et un accroissement du taux de mortalité. L'acquisition de ces multiples résistances a engendré une perte d'efficacité de l'antibiothérapie pour finalement conduire à une impasse thérapeutique.

L'objectif de ce modeste travail est de déterminer et comparer l'activité antimicrobienne de quelques agents antimicrobiens d'origine différente à savoir l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* extraite (origine végétale), l'acide citrique, le chitosane (origine animale), et les complexes chimiques à base de métaux de transition (Cu, Ni ou Co) (origine synthétique). Ces agents sont utilisés d'abord individuellement puis en association (combinaison). L'activité antimicrobienne étant évaluée sur deux quatre microbiennes de références.

Partie I:

Synthèse bibliographique

1-Définition d'un agent antimicrobien

Le terme agent antimicrobien désigne toute substance utilisée pour détruire les microorganismes ou empêcher leur croissance, y compris les antibiotiques et autres agents antibactériens, antiviraux, antifongiques et antiparasitaires (CE, 2001).

2-Agents antimicrobiens d'origine végétale

Ce sont des substances antimicrobiennes dérivant du métabolisme secondaire des végétaux. Ce dernier dérive du métabolisme primaire et fournit des métabolites à faibles quantités, mais dont l'application dans différents domaines, en particulier à intérêt pharmaceutique et cosmétique, voir nutritionnel, sont de la plus grande importance (Harbone, 1998). Les composés phénoliques, les alcaloïdes ainsi que les huiles essentielles font partie du groupe de métabolites secondaires (HADDOUCHI ET BENMANSOUR, 2008).

2-1-Huiles essentielles**2-1-1-Historique**

Les huiles essentielles ont été considérées comme les agents antimicrobiens les plus efficaces présents dans les plantes. Les qualités antimicrobiennes des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité. Toutefois, il aura fallu attendre le début du XXème siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser. Ces propriétés antimicrobiennes sont dues à la fraction des huiles essentielles contenue dans les plantes. Il existe aujourd'hui approximativement 3000 huiles, dont environ 300 sont réellement commercialisées, destinées principalement à l'industrie des arômes et des parfums. Mais la tendance actuelle des consommateurs à rechercher une alimentation plus naturelle a entraîné un regain d'intérêt des scientifiques pour ces substances (ESSAWI, 2000).

2-1-2-Définition des huiles essentielles

Une huile essentielle est un produit odorant, de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche ou par un procédé mécanique sans chauffage (BRUNETON, 2009). Les végétaux riches en essences se trouvent surtout chez les Conifères, Myrtacées, Labiées les Ombellifères, Rutacées, et dans différents organes de la plante (MAUTRAIT ET RAOULT, 2009).

La norme AFNOR NF T 75-006 5FEVRIER 1998 a donné la définition suivante d'une huile essentielle: Produit obtenu à partir d'une matière première végétale soit par entraînement à la vapeur soit par procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des citrus soit par distillation sèche. L'HE est ensuite séparé de la phase aqueuse par des procédés physiques pour les deux premiers modes d'obtention. Elle peut subir des traitements physiques n'entraînant pas de changement significatif de sa composition (BRUNETON, 2008).

La structure du précurseur des HE, l'isoprène, est illustrée dans la Figure 1.

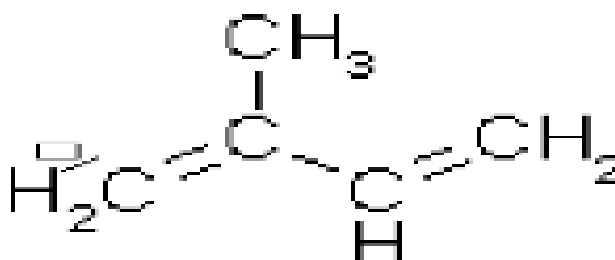


Figure 1: Structure du précurseur des HE : l'isoprène.
(SARNI-MANCHADO ET CHEYNIER, 2006)

2-1-3-Composition chimique des HE

De nombreux travaux scientifiques ont contribué à mettre en évidence la composition chimique des HE. En générale chacune comporte un nombre important de composants (jusqu'à une centaine), tous ne sont pas encore identifiés malgré les progrès de la chimie analytique au cours des dernières années (ROQUEBERT., 2002).

On trouve généralement de nombreux constituants dans une HE appartenant principalement à deux grands groupes chimiques :

- les composés terpéniques
- les composés aromatiques dérivés du phenyl propane

Les huiles essentielles sont des mélanges très complexes, leurs constituants sont principalement des mono-terpènes et des sesquiterpènes de formule générale $(C_5H_8)_n$, les composés oxygénés dérivés de ces hydrocarbures incluent des alcools, des aldéhydes, des esters, des phénols et des oxydes (HAMPSON, 1999).

a- Les composés terpénoïdes

Le terme terpène rappelle la toute première extraction de ce type de composé dans l'essence de térébenthine. Dans le cas des huiles essentielles, seuls les terpènes les plus volatils répondent dans la plupart des cas à la formule générale $(C_5H_8)_n$.

- **Les monoterpènes :** Les carbures sont presque toujours présents, ils peuvent être acycliques (terpinene, cymène) ou bicycliques (pinène camphène). Ils constituent parfois plus de 90 % de l'huile essentielle (citrus, térébenthines)
- **Sesquiterpènes:** Les sesquiterpènes sont de structures très diverses (C_{15}) : les carbures, les alcools et les cétones sont les plus fréquents (BRUNETON, 2008).

b- Les composés aromatiques

Contrairement aux dérivés terpéniques, les composés aromatiques sont moins fréquents dans les huiles essentielles. Très souvent, il s'agit d'allyle et de propénylphénol. Ces composés constituent un ensemble important car ils sont généralement responsables des caractères organoleptiques des huiles essentielles. Nous pouvons citer en exemple l'eugénol qui est responsable de l'odeur du clou de girofle (KUNLE ET OKOGUM, 2003).

c- Les composés d'origines diverses

Compte tenu de leur mode d'extraction, les huiles essentielles peuvent renfermer divers composés aliphatiques, généralement de faible masse moléculaire, entraînés lors de l'hydro distillation. Ces produits peuvent être azotés ou soufrés (INOUE ET ABE, 2003).

-Alcools : menthol, géraniol, linalool,...

-Aldéhydes : géraniol, citronellal,...

-Cétones : camphre, pipéritone

-Phénols: thymol, carvacrol ...

-Esters : acétate de géranyle,...

-Acides : acide gérannique,...

-Oxydes : 1,8-cinéole,... (INOUE ET ABE, 2003).

Les principaux constituants des huiles essentielles doués d'une activité antibactérienne sont rapportés dans le Tableau 1.

Tableau 1: Les principaux constituants des huiles essentielles (HEs) à activité antibactérienne (BURT, 2004).

Nom commun des plantes	Nom latin des plantes	Composés majoritaires des HEs	Composition (%)
Coriandre	<i>Coriandrum sativum</i> (feuilles immatures)	Linalol (E)-2-décanal	26% 20%
	<i>Coriandrum sativum</i> (graines)	Linalol	70%
Cannelle	<i>Cinnamomum zeylandicum</i>	trans-cinnamaldéhyde	65%
Origan	<i>Origanum vulgare</i>	Carvacrol thymol γ -terpinène p-cymène	traces à 80% traces à 64% 2 à 52% traces à 52%
Romarin	<i>Rosmarinus officinalis</i>	α -pinène acétate de bornyle camphre 1,8-cinéole	2 à 25% 0 à 17% 2 à 14% 3 à 89%
sauge	<i>Salvia officinalis</i> L.	camphre α -pinène β -pinène 1,8-cinéole α -thujone	6 à 15% 4 à 5% 2 à 10% 6 à 14% 20 à 42%
clou de girofle	<i>Syzygium aromaticum</i>	eugénol acétate d'eugényle	75 à 85% 8 à 15%
Thym	<i>Thymus Vulgaris</i>	Thymol carvacrol	10 à 64% 2 à 11% 2 à 31% 10 à 56%

Plus de 60 molécules différentes peuvent entrer dans la composition chimique d'une huile essentielle. Les composés majoritaires peuvent représenter, à eux seuls, plus de 85% d'huile alors que d'autres composés ne sont présents qu'à l'état de traces (SENATORE, 1996).

2-1-4-Localisation et lieu de synthèse

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : feuilles, fleurs, écorces, bois, racines, rhizomes, fruits et graines. La synthèse et l'accumulation sont généralement associés à la présence de structures histologique spécialisées, souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante : cellule à huile essentielles, poiles sécréteurs, des poches sécrétrices et canaux sécréteurs (BRUNETON, 1993). Plusieurs catégories de tissus sécréteurs peuvent coexister simultanément chez une même espèce, voir dans un même organe (FAHN, 1998).

2-1-5-Les chémotypes

La connaissance des chémotypes d'une huile essentielle et leur comportement sont fondamentaux car ils permettent d'envisager l'activité pharmacologique, de prévoir aussi la pharmacocinétique et la biodisponibilité. Les huiles essentielles sont élaborées par les plantes aromatiques au sein des cellules sécrétrices. Leur élaboration est totalement tributaire du rayonnement solaire en l'absence duquel le rendement en produits aromatiques et leur nature sont affectés. En sa présence, et tout particulièrement en fonction de la présence de tel ou tel rayonnement, les types de composants pourront varier considérablement au sein d'une même espèce (FRANCHOMME ET PENOËL, 1990). Cette variabilité peut être influencée également par la composition du sol et la position géographique (INOUYE ET ABE, 2003).

2-2-Les polyphénols**2-2-1-Définition**

Les polyphénols sont des groupes de molécules de structures variées (RICHTER, 1993). L'élément structural fondamental qui les caractérisent est la présence d'au moins un noyau benzoïque auquel est directement lié un groupe hydroxyle libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, hétéroside (BRUNETON, 1999). Les composés phénoliques sont synthétisés à partir de métabolites primaires via deux voies :

- la voie de l'acide shikimique
- la voie des poly-acétates (BRAVO, 1998 ; LUGASI *et al*, 2003).

La structure de quelques composés phénoliques est présentée dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Quelques composés phénoliques et leur structure.

Classes	Composés	Références
Quinones	Quinone	(BRUNETON,2009)
Acides phénoliques	Acide gallique	(BRUNETON, 1999)
les coumarines	Coumarine	(COWAN, 1999)
les flavonoïdes	Flavonoïde	(GHEDIRA, 2005)
Les Tannins	Tannin condensé Tannin hydrolysable	(COWAN, 1999)

2-2-2-Composition chimique

A- Les coumarines

Des récentes études ont montré que les coumarines exercent plusieurs activités antimicrobiennes (BENIDICTE ET HOOPER, 1998) : inhibition de la croissance de *Saccaromyces cerevisiae* et de la germination des spores d'*Aspergillus niger*. Pour l'activité antibactérienne on note qu'ils sont plus efficaces contre les Gram positifs (BENKIKI, 2006).

B- Les flavonoïdes

Les flavonoïdes avec leur différentes classes dont les plus importantes sont : les flavones, flavonols, flavonones, flavonones 3-oles, flavanes-3,4 dioles, et les anthocyanidines. (MARFAK, 2003) ont un grand potentiel antibactérien (ALAN ET MILLER, 1996) :

- en se complexant avec des composants des parois avec inhibition de la croissance microbienne (ROJAS *et al*, 1992 ; PERRET *et al*, 1995) ;
- en perturbant leur métabolisme énergétique (JONES *et al*, 1994).

C- Les tanins

Les tanins sont largement connus par leurs propriétés inhibitrices des microorganismes et des enzymes grâce à leur pouvoir à former des complexes stables avec les protéines et en les précipitant (NGUZ *et al*, 1996). Ils exercent une activité antibactérienne par interaction avec la membrane cellulaire qui induit un changement morphologique de la bactérie, en

inhibant l'activité des protéases, des protéines de transport et des andésines (COWAN, 1999). Des effets inhibiteurs de la réplication des virus ont été également décrits *in vitro* (BRUNETON, 1999 ; CHARPENTIER *et al*, 2008)

2-3-Huile essentielle de *Thymus vulgaris*

Comme le montre la Figure 2, *T. vulgaris* est un arbuste aromatique à tiges ramifiées, possédant de petites feuilles de couleur vert foncé, et recouvertes de poils et de glandes (appelées trichomes). Les trichomes contiennent l'huile essentielle majoritairement composée de monoterpènes. *T. vulgaris* est d'ailleurs caractérisé par un polymorphisme floral qui a été au moins aussi étudié que son polymorphisme chimique (BRUNETON, 2009).



Figure 2 : Morphologie générale de la plante *T. vulgaris* (MORALES, 2002).

Classification botanique du *Thymus vulgaris* est présentée dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Classification botanique du *Thymus vulgaris* (EL RHAFARI., 2008)

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

2-3-1-Distribution géographique

Le thym vient du sud de l'Europe, il est issu du thym sauvage qui pousse sur les pentes des montagnes de l'Espagne et d'autres pays du bassin méditerranéen, (VANIER, 2006).

Les appellations attribuées au thym sont thym (en français), zaitra (en arabe), Azoukenni, tazoukennit (en Tamazight).

2-3-3-Composition chimique de l'huile essentielle de *T. vulgaris*

La teneur en huile essentielle de thym varie de 5 à 25 ml/kg et sa composition fluctue selon le chémotype considéré. Les feuilles de thym contiennent 0,5 à 2,5 % d'huile essentielle dont la composition varie beaucoup selon la zone de culture, la variété et surtout les conditions climatiques (BRUNETON, 1999).

La caractéristique de l'huile essentielle de *T. vulgaris* est sa teneur élevée en thymol (GUILLEN ET MANZANOS, 1998 ; BOUHDID *et al.*, 2006). Le thymol (Figure 3) est l'un des principaux phénols reconnus dans l'huile essentielle de quelques Lamiacées comme *T. vulgaris*, l'origan et la sarriette (KALUOSTIAN, 2008). Il s'agit d'un phénol de formule $C_{10}H_{14}O$ (2-Isopropyl-5-méthyl-phenol), qui est un isomère du carvacrol (2-Isopropyl-5-méthyl-phenol), il existe dans l'huile essentielle de thym d'autres hydrocarbures d'une très grande volatilité comme le p-cymène ($C_{10}H_{14}$) et le thymène ($C_{10}H_{16}$) (PAULI ET AL., 1987).

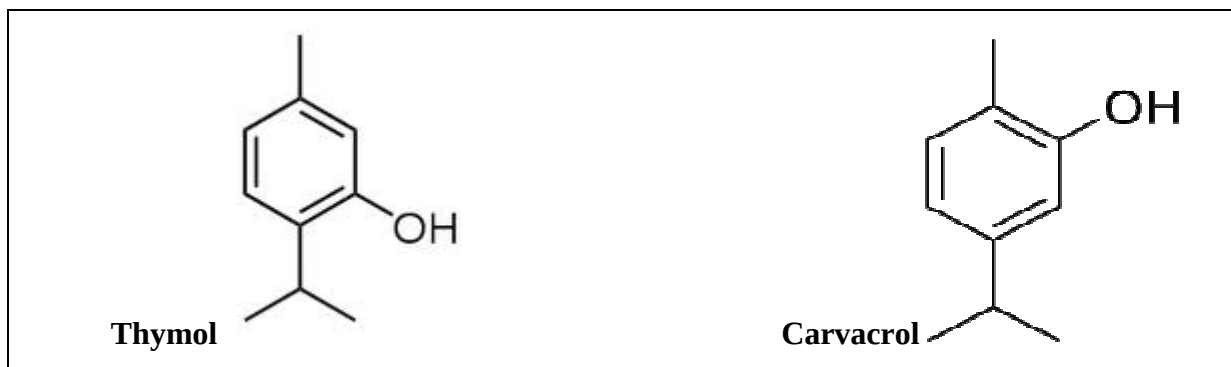


Figure 3 : Structure chimique du thymol et du carvacrol (BRUNETTON, 1999)

3-Agents antimicrobien d'origine animale

3-1-La chitine

La découverte de la chitine par le professeur Français H. Braconn, spécialisé en Histoire de la nature, date du 18ème siècle. Les premiers brevets d'invention en Chitine furent obtenus par Ricardo en 1935. Actuellement, il est connu que la chitine et le chitosane sont des sources renouvelables que l'on peut trouver en abondance dans la nature. Ce fait a attiré plus d'intérêt pour le développement durable. Du fait que la chitine et le chitosane sont deux biopolymères produits par certains animaux. Ils sont donc biodégradables et biorésorbables. Ces deux propriétés sont primordiales à notre époque où la protection de l'environnement est importante (MEKAHLIA, 2007).

3-2-Le chitosane

Le chitosane est un biopolymère non toxique, biocompatible, bioactif et surtout biodégradable obtenu à partir d'un polysaccharide très répandu dans le milieu naturel (la chitine). Cette dernière est en effet considérée comme le polysaccharide le plus abondant après la cellulose avec laquelle elle partage un caractère insoluble. D'un point de vue structural, le chitosane, la chitine et la cellulose sont extrêmement proches. Le faible taux d'acétylation du chitosane lui confère une caractéristique unique dans la grande famille des polysaccharides (AGGAG *et al*, 2006).

3-2-1-Source et structure du chitosane :

Le chitosane est un polysaccharide linéaire (Figure 4) formé d'unités D-glucosamines liées entre elles par des liens glycosidiques et de N-acétyl-D-glucosamine. Le chitosane est dérivé de la chitine, composante principale d'exosquelette des arthropodes ou de l'endosquelette des céphalopodes, des cuticules des insectes. Ce polymère se trouve

également dans la paroi de la plupart des champignons et dans certaines algues chlorophycées, levures et bactéries (TOLAIMATE *et al.* 2003).

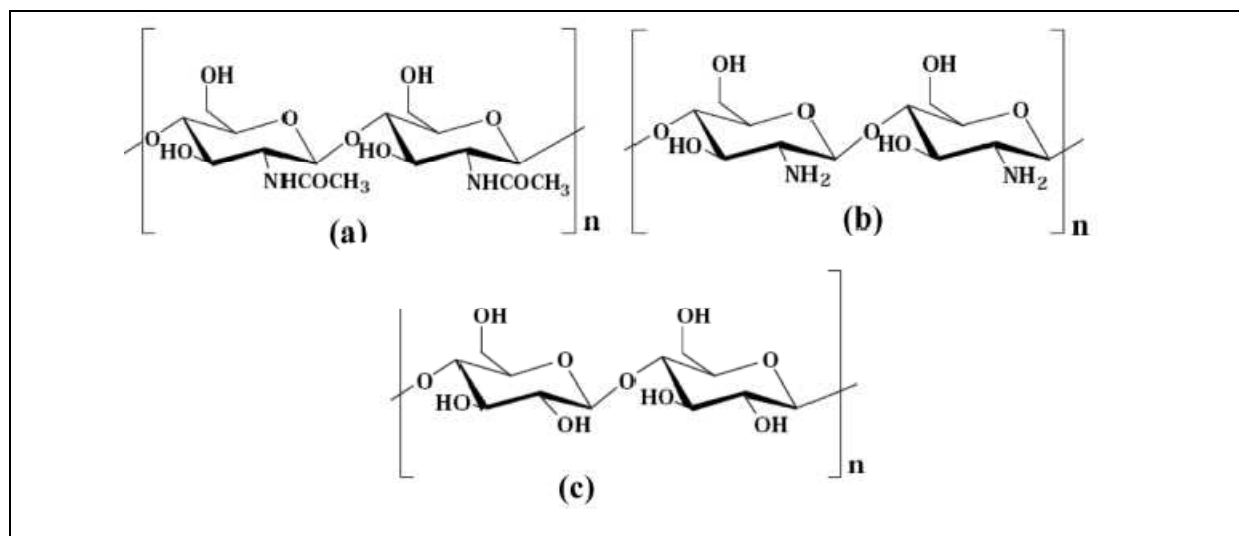


Figure 4 : Structure de la chitine (a), du chitosane (b) et de la cellulose (c)(TAKASHI, 2008).

Les sources importantes de la chitine sont rapportées dans le Tableau 04.

Tableau 4: Sources potentielles de la chitine (TOLAIMATE *et al.*, 2003).

Source de chitine	Teneur en chitine (%)
Crabe marbré (<i>Grapsus marmoratus</i>)	10
Crabe rouge (<i>Portunus puber</i>)	10
Le crabe comestible	70
Crabe araignée (<i>Maia squinada</i>)	16
Homard sauterelle (<i>Scyllarus arctus</i>)	25
Langouste (<i>Palinurus vulgaris</i>)	32
Crevette (<i>Palaemon fabricius</i>)	44
Seiche (<i>sepia officinalis</i>)	20
Calmar (<i>Loligo vulgaris</i>)	40
(<i>Mucor rouxili</i>)	9.4
(<i>Aspergillus niger</i>)	42
(<i>Aspergillus phoenisis</i>)	23.7

3-2-2-Propriétés physico-chimiques

Le chitosane est obtenu après désacétylation de la chitine et ne diffère de celle-ci que par les groupes amines sur la chaîne moléculaire. Cette différence a un effet important sur les propriétés de ce matériau; le chitosane est soluble dans les acides dilués alors que la chitine se dissout difficilement dans les solvants. La « richesse » du chitosane et son degré de désacétylation en font un polymère particulièrement intéressant pour une multitude d'applications biologiques (ZEMMOURI, 2008).

La viscosité du chitosane dépend de son degré désacétylation : plus il est désacétylé plus il y a de groupements amines libres, plus le chitosane est soluble et plus sa viscosité est importante. Le chitosane est un copolymère hydrophile; il peut se dissoudre dans des solutions organiques ou inorganiques diluées d'acides (ZEMMOURI, 2008).

3-2-3-Le degré de désacétylation (DDA)

La chitine et le chitosane sont principalement caractérisés par leur degré de désacétylation (DDA) et par leur masse molaire, dont la détermination nécessite la mise en solution du polymère (CRINI ET AL., 2009). De nombreuses méthodes sont proposées afin de déterminer le DDA :

Sur des échantillons solides :

- la spectroscopie IR (BRUGNEROTTO *et al.*, 2001) ;
- l'analyse élémentaire (KASAAI *et al.*, 1999) ;
- la RMN solide (HEUX *et al.*, 2000) ;

Sur des échantillons en solution :

- dosage UV et (WU & ZINANOVIC , 2008) ;
- titrage colloïdal (CHEN, *et al.*, 1997) ;
- RMN liquide (YANG ET MONTGOMERY, 2000) ;
- Dosage conductimétrique (YU *et al.*, 1999) ;
- Dosage pH-métrique (TOLAIMATE *et al.*, 1999).

3-2-4-Processus de la désacétylation du chitosane

Le chitosane obtenu industriellement a une masse molaire de l'ordre de 200 000 g.mol et un DDA allant de 75 à 98% (PILLAI *et al.*, 2009). La masse molaire et la répartition des motifs N-acétylés le long de la chaîne sont dépendantes de la méthode de désacétylation

utilisée (CRINI *et al.*, 2009). De plus, un enchaînement successif de plusieurs motifs N-acétylés confère au polymère un caractère plus hydrophobe (CRINI *et al.*, 2009), et donc des propriétés auto associatives (propriétés épaississantes et gélifiantes) et modifie sa solubilité (MUZZARELLI, 1977), à une température supérieure ou égale à 100 °C, pendant au moins 30 minutes, pour enlever certains ou tous les groupements acétyls de la chitine (NO ET MEYERS, 1995).

La désacétylation ne peut pas être réalisée avec un réactif acide (MUZZARELLI, 1977). Il y a plusieurs facteurs essentiels qui affectent le rendement de désacétylation comme la température, la durée, la concentration d'alcalin, les traitements préalables pour l'obtention de la chitine, l'atmosphère (air ou azote), la quantité de chitine par rapport à la solution alcaline, densité de la chitine et la taille des particules (CRINI *et al.*, 2009).

3-2-5-Extraction de la chitine et sa transformation en chitosane

La totalité du processus permettant de passer de l'extraction de la chitine à l'obtention de chitosane est schématisée dans la Figure 5.

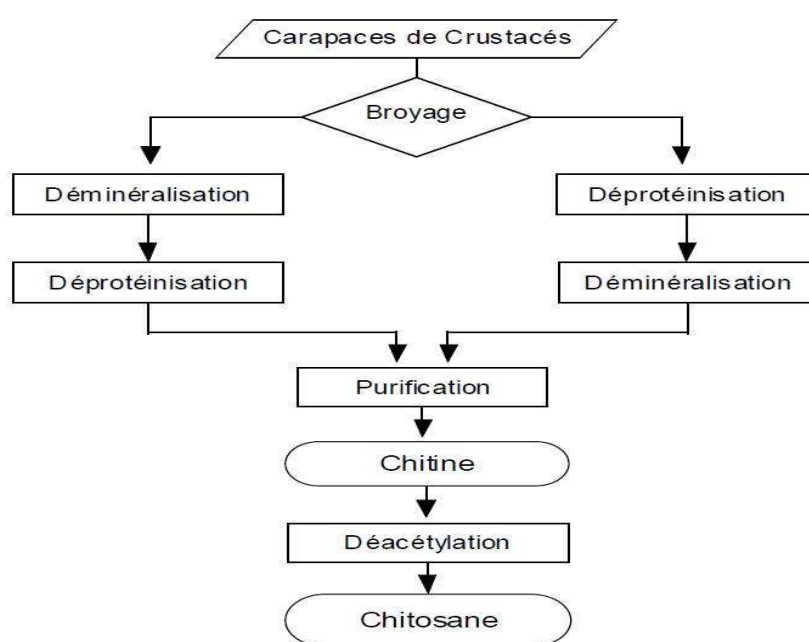


Figure 5: Procédé de la fabrication de chitine et chitosane (SUYATMA, 2006).

4-Agents antimicrobiens d'origine microbienne**4-1-Bactériocines**

Contrairement aux antibiotiques classiques, les bactériocines sont synthétisées par voie ribosomique généralement par des bactéries à Gram positif appartenant au groupe des bactéries lactiques. Elles peuvent subir ou non des modifications post-traductionnelles avant d'être excrétées dans le milieu extracellulaire. Leur spectre d'action antibactérien est généralement étroit, comprend souvent des souches appartenant à la même espèce que la souche productrice. Cette dernière produit une protéine d'immunité pour se protéger des effets délétères de la bactériocine qu'elle produit (JACK *et al.*, 1995).

4-1-1- Classification des bactériocines

Il existe plusieurs classifications, la première est fondée sur les spectres d'action (KLAENHAMMER, 1988). Les connaissances acquises ont permis de créer une classification reposant sur les structures et les mécanismes d'action des BACTERIOCINES (KLAENHAMMER, 1993). Cette dernière a été modifiée par l'ajout de sous-classes et est actuellement utilisée.

Cette classification se décompose en quatre classes distinctes :

Classe I : il s'agit de peptides de taille réduite (< 5 kDa) contenant des acides aminés inhabituels obtenus par modifications post-traductionnelles. Un de ces acides aminés caractéristiques est la lanthionine ; c'est pourquoi les bactériocines appartenant à la classe sont appelées lantibiotiques pour "*lanthionine containing antibiotics*". La nisine est la bactériocine de la classe I la plus étudiée. La structure de ces bactériocines diffère selon la localisation des ponts établis entre les acides aminés inhabituels (twomey *et al.*, 2002).

Classe II : cette classe regroupe les petites bactériocines (< 10 kDa) thermostables et ne subissant pas de modification post-traductionnelle; cependant elles sont généralement synthétisées sous forme d'un prépeptide qui sera mûré lors de son excrétion dans le milieu extracellulaire. Le site du clivage protéolytique du peptide leader s'effectue généralement au niveau d'un doublet de glycine (WANG *et al.*, 1999).

Classe III : cette classe regroupe les bactériocines de haut poids moléculaire (> 30 kDa) qui possèdent une activité antimicrobienne. Ces protéines contrairement aux peptides de la classe II ne sont pas thermostables. L'entérolysine A, synthétisée par *Enterococcus faecalis*,

appartient à cette classe et présente une activité anti-*Listeria* sp. (NIGUTOVA *et al.*, 2008). Cette protéine possède dans sa région N-terminale une activité, « *endopeptidase-like* ». De plus, sa région C-terminale est similaire au gène de lyse de bactériophages (A2, T4).

Le mécanisme d'action de cette bactériocine repose sur une activité muralytique permettant la dégradation de la paroi de la cellule cible (NILSEN *et al.*, 2003).

Classe IV : cette dernière classe regroupe les protéines couplées à une partie non protéique Cette classe est très peu représentée voire éliminée (DRIDER *et al.*, 2006).

4-2-Les acides organiques

Les produits principaux du métabolisme des bactéries lactiques sont les acides organiques, ceux ci sont produits soit par la voie homofermentaire, soit par la voie hétérofermentaire. Le métabolisme du pyruvate conduit à la formation uniquement d'acide lactique chez les homofermentaires tandis qu'il conduit à la formation d'acide lactique, acétique et formique, d'éthanol et de dioxyde de carbone chez les hétérofermentaires (LIU, 2003).

4-2-1-L'acide citrique

L'acide citrique (acide 2-hydroxy-1,2, 3-propanetricarboxylique) (Figure 6) est très diffus dans la nature (MORETTI ET FELIPPONE, 2000). Il est solide, blanc, incolore, inodore, d'une saveur excessivement aigre (EUGENE, 1837). Il intervient dans le métabolisme de nombreux animaux et plantes. Il a été isolé sous forme cristalline à partir du jus de citron, en 1784, par SHEELE. Sa structure a été établie par LIEBIG en 1838. La synthèse chimique de l'acide citrique, à partir de la glycérine, remonte à 1880. En 1893, WETTMER découvrit quelques micromycètes capables de produire de l'acide citrique par fermentation de substrats contenant du sucre. Les premiers équipements industriels remontent au début du siècle. Ils produisaient l'acide citrique par extraction à partir de citrons (qui en contiennent de 7 à 9 %) ; jusqu'en 1920, plus de 90 % de la production mondiale d'acide citrique était réalisée en Italie. À cette époque le procédé industriel par fermentation, en utilisant *Aspergillus niger* comme microorganisme producteur et le sucre comme matière première commença à se développer en Europe et aux États-Unis. Au début des années 30, 80 % de la production mondiale d'acide citrique était réalisée par fermentation. De nos jours, l'acide citrique est produit par des techniques de fermentation « en surface » et en « submergée » (MORETTI ET FELIPPONE, 2000).

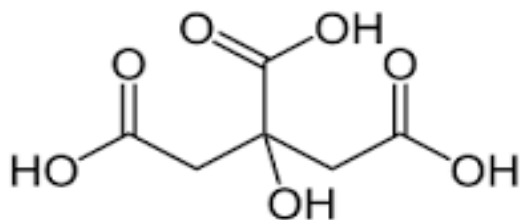


Figure 6: Structure chimique de l'acide citrique (LIU, 2003)

5-Agents antimicrobiens d'origine microbienne ou synthétique

Les antibiotiques sont définis comme toute substance antibactérienne d'origine biologique, synthétique ou semi synthétique (LAVIGNE, 2007), capable d'inhiber sélectivement certaines voies métaboliques des bactéries, sans exercer habituellement d'effets toxiques pour les organismes supérieurs (PERRONNE, 1999).

L'étendue de l'activité antibactérienne d'un antibiotique définit son spectre d'action. Plus un antibiotique agit sur des espèces bactériennes différentes, plus son spectre est large.

L'action des antibiotiques peut s'exercer sur des structures ou des mécanismes essentiels à la croissance ou à la survie des bactéries. Ainsi, ceux qui inhibent la croissance bactérienne sont qualifiés de «bactériostatiques» alors que ceux qui tuent les bactéries sont dits «bactéricides».

Les antibiotiques sont majoritairement représentés par des molécules d'origine naturelle et leurs dérivés. Ils peuvent aussi être d'origine synthétique ou semi-synthétique (NEWMAN *et al.*, 2003 ; SINGH ET BARETT, 2006). Les antibiotiques synthétiques sont obtenus, soit à partir de dérivés totalement artificiels, soit en recréant des substances initialement extraites de microorganismes.

Les antibiotiques semi-synthétiques sont issus de la modification en laboratoire, de substances produites par des micro-organismes. Les antibiotiques sont groupés par familles ou classes en fonction de leurs propriétés structurales. Pratiquement toutes les classes d'antibiotiques ont été découvertes dans un « âge d'or », qui s'est étendu de 1936 à 1962.

Les antibiotiques sont classés en plusieurs familles, dont les principales familles sont regroupées dans le Tableau 5.

Tableau 05: Classification des principales familles d'antibiotiques (SINGH ET BARRETT, 2006).

Classe	Origine	Exemple
Sulfamides	Synthétique	Sulfaméthoxazole
β- Lactames de 1ère génération	<i>Penicillium Notatum</i>	Pénicilline
β- Lactames de 2ème génération	<i>Cephalosporum</i>	Céphalosporine
Phénylpropanoïdes	<i>Streptomyces venezuelae</i>	Chloramphénicol
Macrolides	<i>Streptomyces erythraeus</i>	Erythromycine
Tétracyclines	<i>Streptomyces</i>	Tétracycline
Aminoglycosides	<i>Streptomyces Micromonospora</i>	Streptomycine
Quinolones et fluoroquinolones	Synthétique	Ciprofloxacine

6-Agents antimicrobien d'origine synthétique

6-1-Structure des complexes chimiques

Un complexe chimique, ou complexe de coordination ou de métal, est constitué d'un atome central ou ion, qui est généralement métallique et que l'on appelle le centre de coordination, et un réseau périphérique de destination des molécules ou des ions, qui sont à leur tour connu sous le nom de ligands ou des agents complexants. De nombreux composés contenant des métaux, en particulier ceux des métaux de transition, sont des complexes de coordination. La chimie des complexes de métaux de transition est dominée par les interactions entre les orbitales des ligands et les orbitales des ions métalliques. L'ensemble de ces orbitales peuvent comporter jusqu'à 18 électrons. L'indice de coordination maximale pour un certain métal est donc lié à la configuration électronique de l'ion métallique (pour être plus précis, le nombre d'orbitales vides) et au rapport entre la taille des ligands et l'ion métallique (NORMAN, 1999).

6-1-1-Dimethylglyoxime

La diméthylglyoxime (Figure 7) est un ligand chélatant avec une bonne capacité à former des complexes mono et bi ou trinucléaire. La diméthylglyoxime ou plus généralement le mono anion de la diméthylglyoxime (H_2dmg) avec les deux azotes de la fonction oxime peut chélater les cations métalliques (Cu, Ni, Co) pour former des complexes plan-carrés ou octaédriques dont la structure est stabilisée par des liaisons hydrogène ou covalentes datives (CHAKRAVARTY, 1974).

Le groupe oxime ($C=N-OH$) qui est considéré comme dérivé d'oxy-imine est amphotère, l'atome d'azote de la fonction ($N-OH$) se comporte comme une base de Lewis, le groupe hydroxyle présente un caractère acide.

(BIRSEN, 2006). Les oximes sont des ligands versatiles, forment des chélates stables avec les métaux de transition qui présentent une grande variété de structure (GAGELLI *et al.*, 2001).

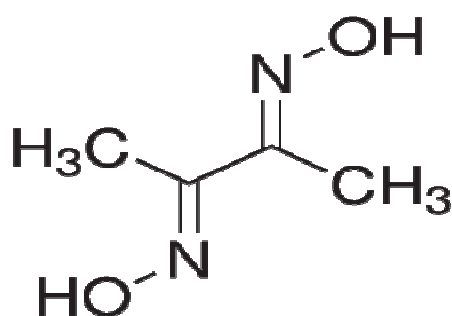


Figure 7 : Structure de la diméthylglyoxime (JEAN, 1974)

6-1-2-Les acides aminés

Les acides aminés (Figure 8) sont considérés comme des principaux agents complexants dans les milieux tampons d'ions métalliques et sont utilisés comme agents chélateurs analytiques (MOHAMED *et al.*, 2004).

Parmi toutes les structures d'acides aminés, les acides alpha-aminés présentent un intérêt particulier, car il jouent un rôle fondamental dans la constitution des tissus et des processus chimiques du vivant (BRIJITTE *et al.*, 2004).

Les acides aminés, dérivés de l'hydrolyse de protéines, présentent tous une structure similaire. Ils sont constitués d'une fonction acide carboxylique et d'une fonction amine reliées entre elles par un carbone asymétrique appelé carbone *alpha* (à l'exception de la glycine). Les

acides aminés sont donc des molécules chirales. Ce carbone alpha est substitué par un hydrogène et une chaîne latérale qui donne son identité à chacun des acides aminés (JEAN, 1988).

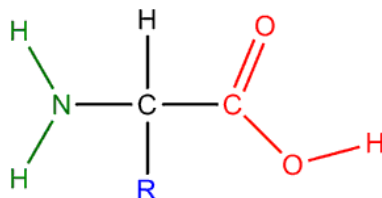


Figure 8 : structure général d'un acide aminé

6-1-3-Le cuivre

Le cuivre est un élément de transition appartenant au même groupe du tableau périodique que l'or et l'argent. Il fait partie de la première série des métaux de transition. Ces composés sont caractérisés par la présence de niveaux électroniques 3d incomplets. Ce métal a quatre états d'oxydation (COTTON ET WILKINSON, 1988).

Parmi les métaux de la première série de transition, le cuivre est un élément essentiel pour la plupart des formes de vie. Il existe dans les plantes et les animaux et joue un rôle important dans le métabolisme humain (PHIPPS, 1976 ; WALKER, 1980). Il constitue notamment le cofacteur des enzymes impliqués dans plusieurs processus biologiques tels que la respiration (cytochrome oxydase) ou la suppression des espèces réactives à l'oxygène (superoxyde dismutase) (RIGO *et al.*, 2004).

De nombreuses études ont montré que les ions de Cu et de Ni sont capables de déprotoner l'azote de l'amide en formant une espèce chélate stable (BOUDESOCQUE *et al.*, 2008).

6-2-Les antiseptiques et les désinfectants

Les antiseptiques et les désinfectants sont des produits chimiques antimicrobiens capables de tuer les micro-organismes (bactéries, champignons, protozoaires ou virus) ou d'inhiber leur croissance. Leur utilisation permet de réduire le nombre de micro-organismes indésirables à un niveau tel que le risque de transmission d'une infection puisse être éliminé.

- Les antiseptiques sont utilisés sur les tissus vivants.
- Les désinfectants sont utilisés sur les matières inertes.

Le terme "désinfection" désigne normalement le traitement d'objets inertes effectué avec un désinfectant, mais il est souvent utilisé en pratique à la place du terme "antisepsie" pour parler du traitement de la peau, des muqueuses ou des plaies effectué avec un antiseptique.

1-L'Activité antimicrobienne des huiles essentielles

Les huiles essentielles ont un spectre d'action très large puisqu'elles inhibent aussi bien la croissance des bactéries que celle des moisissures et des levures. Leur activité antimicrobienne est principalement en fonction de leur composition chimique, en particulier de leurs composés volatils majeurs (SIPAILIENE *et al.*, 2006; MEBARKI, 2010). Une même plante aromatique peut présenter une composition différente en HE, suivant les parties utilisées, la période de cueillette, la localisation géographique et même suivant le protocole d'extraction ou le mode d'utilisation (ISERIN, 2001).

Le carvacrol et le thymol, possèdent une activité antibactérienne et une activité antifongique contre les mycètes phytopathogènes (SCHWÄMMLE *et al.*, 2001).

1-2-Activité liée à la composition chimique

Le principal facteur modulant le spectre d'activité des HE est le type et la structure moléculaire des composants actifs présents dans les HE; ainsi *in vitro* on observe une activité antimicrobienne plus élevée des terpènes oxygénés en comparaison aux terpènes à hydrocarbures (DORMAN ET DEANS, 2000).

Le pouvoir antimicrobien des HEs est probablement en rapport avec leur fort contenu en composés phénoliques (SOKMEN *et al.*, 2007), mais ces derniers ne sont pas les seuls responsables de l'intégralité de l'activité, la totalité de la composition chimique devant être prise en compte (COSENTINO *et al.*, 1999). LAHLOU (2004) a montré que les activités antimicrobienne, antivirale, insecticide, larvicide des extraits totaux des HE's sont supérieures à celle des composés majoritaires testés séparément. Ces données ont été confirmées par ROTA *et al.* (2008) dans une étude *in vitro* sur les microorganismes pathogènes isolés des aliments.

Le thymol et le carvacrol sont parmi les composés des huiles essentielles les plus actifs contre les champignons. Ces deux molécules possèdent un très large spectre d'activité antimicrobienne et ils sont naturellement présents dans les essences de la plupart des espèces de thym et d'origan (EL AJJOURI *et al.*, 2008).

1-3-Activité liée au type de microorganismes

Un autre paramètre important déterminant l'activité antimicrobienne des HE's est le type de microorganismes ciblés, c'est ce qu'on appelle le « spectre d'activité ». En général, les différents microbes n'ont pas une sensibilité similaire vis-à-vis des HE's (MEBARKI, 2010).

LAHLOU (2004) a aussi montré que l'HE peut être biocide vis-à-vis de certaines souches et biostatique en vers d'autre ou n'avoir aucun effet. Donc, il est important de mentionner la dénomination complète: le Gram des microorganismes ainsi que l'espèce botanique et le chemotype des HE's (MEBARKI., 2010). La susceptibilité des bactéries serait en effet indépendante du Gram (BEKHECHI *et al.*, 2008 ; SOKMEN *et al.*, 2004) ou dépend des HE's utilisées.

Les travaux de SHIGEHARU *et al* 2006 ont montré que les HE's suscitent actuellement beaucoup d'attention parce qu'elles ont une activité contre les pathogènes résistant aux antibiotiques tels que :

- Meticillin - résistant (*S. aureus*)
- Vancomycin-résistant (*Enterococcus pneumoniae*)
- Itraconazole-résistant (*Candidat sp*)

1-4-Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne

Les méthodes utilisées pour évaluer l'activité antimicrobienne *in vitro* des HE's sont nombreuses et donnent parfois des résultats différents selon les conditions expérimentales adoptées par chaque manipulateur (SUHR ET NIELSEN 2003).

1-5-Mécanismes d'action des huiles essentielles

Du fait de la variabilité des teneurs et des profils des composants des HE's, il est probable que leur activité antimicrobienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à différentes cibles d'action au niveau cellulaire (CARSON *et al*, 2002). De façon générale il a été observé une diversité d'actions toxiques des HE's :

- La perturbation de la membrane cytoplasmique,
- La perturbation de la force motrice des protons,
- La fuite d'électrons,
- La coagulation du contenu protéique des cellules. (DORMAN ET DEANS, 2000 ; OUSSALA *et al.*, 2006 ; BEKHECHI, 2008).

COX *et al.* (2000) ont rapporté que l'activité antifongique des HE's est due à une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique suivie de sa rupture entraînant une fuite du contenu cytoplasmique et donc la mort de la cellule.

Les composés terpéniques des HE's et plus précisément leurs groupements fonctionnels tels que les phénols et les aldéhydes réagissent avec les enzymes membranaires et dégradent

la membrane plasmique de la levure. Le mécanisme de l'action des terpènes n'est pas entièrement compris mais on pense qu'il s'agit de la rupture de la membrane par les composés lipophiles (COWAN, 1999).

Certains composés phénoliques des huiles essentielles interfèrent avec les protéines de la membrane des micro-organismes comme l'enzyme ATP ase, soit par action directe sur la partie hydrophobe de la protéine, soit en interférant dans la translocation des protons dans la membrane prévenant la phosphorylation de l'ADP. Les huiles essentielles peuvent inhiber la synthèse de DNA, RNA, des protéines et des polysaccharides, inhibition de la décarboxylation des acides aminés chez entérobactéries.

Les études sur les mécanismes d'action de cette activité sont en nombre négligeable.

Jusqu'à présent, il n'existe pas d'étude pouvant nous donner une idée claire et précise sur le mode d'action des HE's. Etant donné la complexité de leur composition chimique, tout laisse à penser que ce mode d'action est assez complexe et difficile à cerner du point de vue moléculaire. Il est très probable que chacun des constituants des huiles essentielles a son propre mécanisme d'action; d'une manière générale, leur action se déroule en trois phases :

- L'attaque de la paroi bactérienne par l'huile essentielle, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires ;
- acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure ;
- destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie Le mode d'action des huiles essentielles dépend aussi du type de microorganismes (SIKKEMA *et al.*, 1995).

Les sites d'action des HE's sur la cellule bactérienne sont indiqués dans la Figure 9.

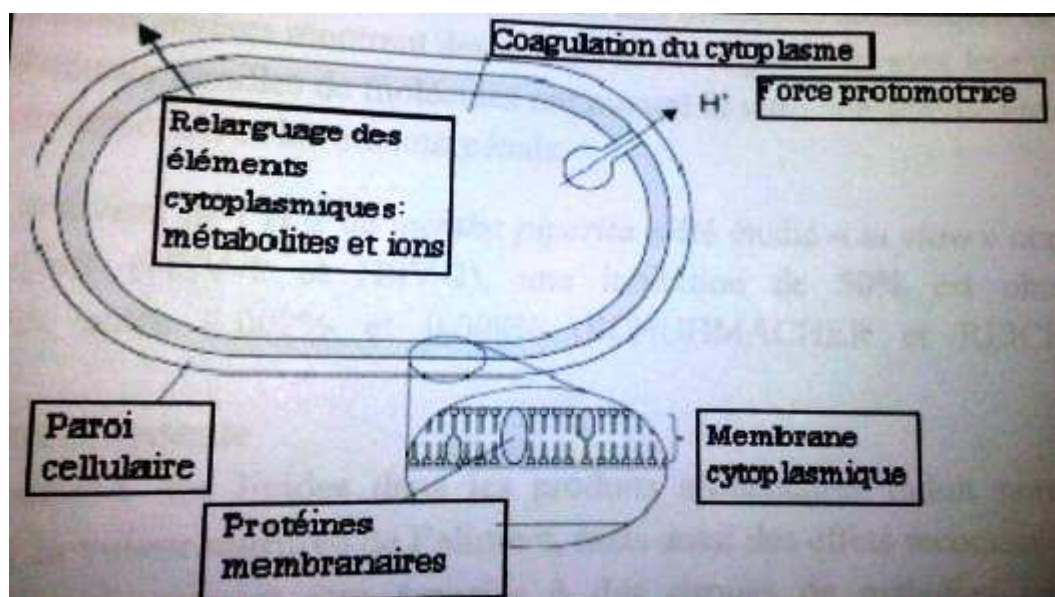


Figure 09 : Sites d'action des HE's sur la cellule bactérienne (BURT.2004)

1-6-Mécanisme d'action du thym

Le thymol et le carvacrol sont les deux principaux composants de l'huile de thym à présenter une activité antimicrobienne (BURT, 2007). Il a été démontré qu'ils augmentent la perméabilité de la membrane cellulaire des bactéries, réduisent la force proto-motrice et diminuent ainsi le taux intracellulaire d'adénosine triphosphate, ou ATP (la molécule qui fournit l'énergie nécessaire aux réactions métaboliques dans la cellule) (ULTEE *et al.*, 1999 ; XU *et al.*, 2008).

1.7. Synergies entre les composants d'une huile essentielle

L'interaction entre les composants d'une huile essentielle peut avoir trois résultats différents : synergiques, additifs ou antagonistes.

L'activité inhérente des huiles essentielles ne peut pas compter exclusivement sur le rapport dans lequel les principaux constituants actifs sont présents, mais également sur les interactions entre les constituants mineurs dans l'huile.

Il ya un nombre limité de documents portant sur le mécanisme d'action de combinaisons des huiles essentielles ou de leurs composants. Cependant, il ya des mécanismes généralement reconnus.

L'interaction des agents antimicrobien qui produisent une synergie, Ils comprennent l'inhibition séquentielle d'une voie biochimique, ainsi que l'inhibition des enzymes de

protection et de l'utilisation d'agents actifs de la paroi cellulaire pour augmenter l'absorption d'autres composés antimicrobiens (HYLDGAARD *et al* 2012).

La capacité des hydrocarbures d'interagir avec les membranes cellulaires des microorganismes et facilite la pénétration de carvacrol dans la cellule, (PEI *et al*) ont émis l'hypothèse que les effets synergiques du carvacrol et l'eugénol et du thymol peut être dû au fait que le carvacrol et le thymol ai désintégrée la membrane externe de *E. coli*, ce qui facilite la pénétration de l'eugénol pour entrer dans le cytoplasme et de les combiner avec des protéines.

De récentes études on était établis sur l'effet synergique de l'eugénol et du cinnamaldehyde la combinaison de la paire de ces composants montrant des effets synergiques, cela permet alors de réduire la concentration nécessaire pour obtenir le même effet antimicrobienne par rapport à la somme purifiée (IMAËL NESTOR ET RODOLFO, 2012) .

La combinaison de l'aldéhyde cinnamique et des taux réduits de l'eugénol a généré une réduction de la concentration de 50%.

Certains auteurs proposent deux hypothèses qui pourraient expliquer l'effet synergique entre le thymol et le carvacrol contre *S. typhimurium*:

- le mécanisme antibactérien du thymol et du carvacrol pourrait être différent; ils agissent sur les différentes cibles ;
- l'effet synergique pourrait être en raison de la similitude de leur mécanisme; et des sites d'action.

Bien que les effets antimicrobiens des huiles essentielles soient bien établis, le mécanisme d'action de ces composés est mal compris. De plus le mode d'action des bactériocines et des acides faibles, il ya trop peu d'études qui tentent une telle vision pour les huiles essentielles. La recherche actuelle sur l'action antimicrobienne de composés phénoliques concentre sur leurs effets sur les membranes cellulaires (DAVIDSON, 1997; ULTEE *et al.*, 1999). Une étude plus poussée sur le mode d'action de certaines combinaisons de mélanges d'huiles essentielles à différents niveaux de concentration contre des micro-organismes afin d'élargir les connaissances sur l'utilisation de ces additifs naturels dans la pratique industrielle (LAMBERT *et al.*, 2001).

2-Mécanisme d'action des bactériocines

La première action consiste en la fixation du peptide sur la membrane de la cellule cible. C'est durant cette étape que le peptide adopte sa conformation tri dimensionnelle permettant l'expression de son activité.

La seconde étape est l'insertion de la bactériocine dans la membrane cytoplasmique. Durant cette étape, plusieurs peptides antibactériens sont recrutés pour former un pore.

La dernière étape est la formation du pore, ce dernier conduit à des fuites de composés intracellulaires vitaux. Leur perte entraîne donc des effets néfastes pour la cellule, allant d'un simple ralentissement de la vitesse de croissance bactérienne à la mort cellulaire (JASNIEVSKI, 2008).

La fixation de la bactériocine sur la cellule cible constitue la première étape du mécanisme d'action du peptide antibactérien. Cette interaction est de nature électrostatique (CHEN *et al.*, 1997) car le peptide est cationique et la membrane anionique. La formation de pores dans la membrane n'est pas due à l'action d'un peptide seul, il existe donc un regroupement de bactériocines dans la membrane afin de permettre la formation d'un pore (HUANG, 2006).

La formation de pores ou de canaux transmembranaires dans la membrane par assemblage des hélices, les parties hydrophobes des peptides interagissent avec la partie apolaire de la membrane et que leurs parties hydrophiles soient orientées vers l'extérieur pour former un pore aqueux. Les pores formés permettent le passage des bactériocines à travers la membrane externe pour qu'elles puissent agir sur la membrane cytoplasmique via le même mécanisme (BROGDEN, 2005).

Les conséquences immédiates de la formation de pores sont des fuites de composés intracellulaires aboutissant à une dépolarisation de la membrane cytoplasmique, à un dysfonctionnement enzymatique, puis à la mort cellulaire (JASNIEVSKY, 2008).

Le mode d'action des bactériocines produites par les bactéries lactiques est illustré dans Figure 10

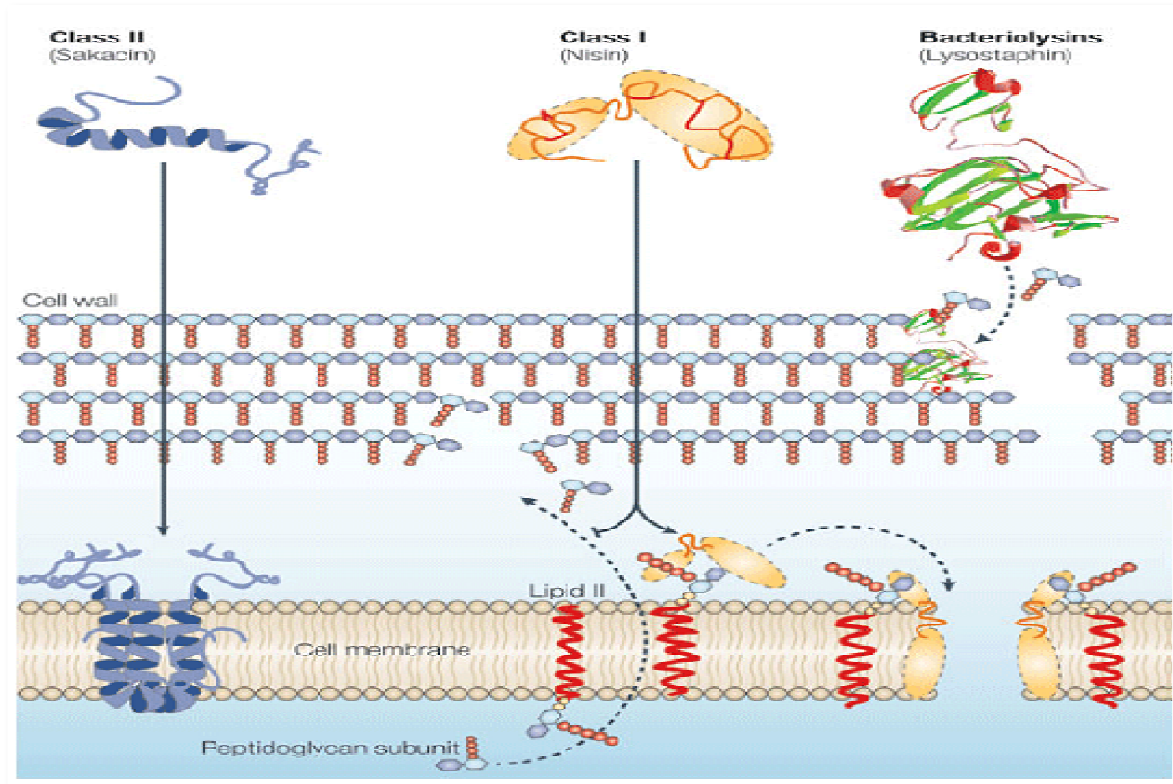


Figure 10 : Mode d'action des bactériocines de bactéries lactiques (COTTER *et al.*, 2005).

3-Mécanismes d'action du chitosane

L'activité antimicrobienne du chitosane a été abondamment décrite et publiée ces dernières années pour son action contre une large variété de micro-organismes incluant des espèces bactériennes et fongiques. Une activité bactéricide a clairement pu être identifiée chez des flores pathogènes ou d'altération incluant des Gram+ et des Gram- (SAGOO *et al.*, 2002).

Le mode d'action exact du chitosane n'est pas encore entièrement compris, bien que plusieurs mécanismes ont été proposés pour son activité (RABEA *et al.*, 2003), .

Le mode d'action du chitosane est affecté par plusieurs facteurs, comme l'environnement, le micro-organisme et l'état physique, en fonction de leurs rôles respectifs. Le mode d'action dépend du composé actif et de la cible. Les applications générales antimicrobiens de chitosane et les perspectives sur les futures études dans ce domaine sont considérées comme prometteuses (MING KONGN, 2010).

La principale caractéristique du chitosane est sa charge positive au niveau des groupements amine ($-NH_3^+$) à l'extrémité du carbone numéro 2 positionné dans le monomère de glucose, lorsque le pH est inférieur à son pKa (6,3). Ceci forme une structure

polycationique qui peut interagir avec les composés anioniques et les structures macromoléculaires de bactéries (HELANDER *et al.*, 2001).

Cette interaction de charge peut modifier la surface bactérienne en augmentant la perméabilité membranaire, causant la fuite de substances intracellulaires (par exemple, des protéines, y compris lactate déshydrogénase, d'acides nucléiques et le glucose) ou une diminution de la perméabilité de la membrane, ce qui empêche le transport des éléments nutritifs (JEON, 2001; KUMAR *et al.*, 2007).

Une étude de PEREZ (2009) a révélé que l'activité bactéricide de la solution de chitosane et d'acétate contre *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* se traduit par une augmentation de la perméabilité de la membrane bactérienne avec la sortie du contenu cellulaire. Ce dommage est probablement causée par l'interaction électrostatique entre les groupes amines ($-NH_3^+$) avec les composants phospholipides des membranes cellulaires.

Il a été également suggéré qu'il y'a formation d'une couche imperméable autour de la cellule bactérienne, cette dernière bloquant ainsi le transport de solutés essentiels dans la cellule induisant la mort cellulaire (CHEN *et al.*, 2003).

4-Activités biologiques des complexes

En fait, de nombreux complexes de métaux d'origine naturelle sont des complexes de ligands mixtes (PERRING ET AGGARWAL, 1973) contenant deux ou plusieurs molécules avec des ligands différents, le ligand est une macro molécule unique ayant deux ou plus différents types d'atomes donneurs .En outre, les complexes de ligands mixtes sont généralement biologiquement plus actifs que le ligand lui-même .L'utilisation de complexes métalliques dans lutte contre les infections a été rapportée par plusieurs auteurs (PIERRE ET KOLAWOLE, 2005).

La propriété la plus importante pour expliquer le rôle des métaux (cuivre, nickel et cobalt) est leur faculté à se fixer sur les protéines et en changeant alors leurs propriétés. Ces métaux siègent en tant que composant structurel des protéines ou en tant que cofacteurs intrinsèques dans les réactions catalytiques (ROBERT, 1995).

Il est prouvé que beaucoup de substances naturelles se présentent sous forme de complexes métalliques qui jouent un rôle fondamental dans le domaine de la catalyse et dans le transport des substances actives à travers les membranes plasmiques des cellules (DIOP, 2004).

Les acides aminés sont connus pour leur coordination aux ions métalliques après déprotonisation (ABDELRAHMANE ET BATTAGLIA, 1996). Les complexes avec les acides aminés à l'état solide sont stables à l'air et à température ambiante. Ils sont insolubles dans l'eau mais solubles dans l'éthanol et le DMSO (ADKHIS, 2003).

4-1-Activité antimicrobienne des complexes chimiques

Les activités antimicrobiennes des complexes chimiques ont été évaluées par la méthode de diffusion de puits. L'activité antibactérienne a été étudiée sur bactéries à Gram positif (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*), des bactéries à Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsilla pneumoniae*) et des souches fongiques (*Candida albicans*, *Penicillium chrysogenum*). Les milieux Mueller Hinton Agar et la pomme de terre, dextrose et agar ont été utilisés comme supports pour l'étude antibactérienne et antifongique (TIJANI-RAHMOUNI, 2014).

Les complexes de cuivre présentent diverses structures, ayant des propriétés d'oxydoréductions, des d'importantes applications dans chimie bio-inorganique et la préparation des matériaux fonctionnels, ainsi que des propriétés biologiques et pharmaceutiques, telles que les activités antimicrobienne, antivirale, antiparasitaire et anticancéreuse.

4-2-Mécanismes d'action des complexes de cuivre

Le cuivre (II) est le troisième bio-ion le plus essentiel en raison de sa nature labile vers la coordination des ligands (RAJALAKSHMI *et al.*, 2012). Il joue également un rôle central dans la chimiothérapie comme il s'accumule dans les cellules tumorales pour sa perméabilité sélective à travers les membranes cellulaires (ALAGESAN, 2013). Le stress oxydant cause des dommages sur les molécules d'ADN, lipides et protéines.

Des études récentes ont démontré que l'ADN est la cible la plus préférée pour la plupart des activités biologiques anti-cancer et des thérapies antivirales (MANIKANDAMATHAVAN *et al.*, 2014). Le mode de liaison entre des complexes de métaux de transition avec l'ADN a été l'échafaudage pour la chimie médicinale bio-inorganique. En particulier, le cuivre et ses ligands ont été largement étudiés en raison de leurs fortes interactions avec ADN via des associations de surface ou intercalation puis de clivage de l'ADN à travers des mécanismes d'hydrolyse ou d'oxydation (CHEN *et al.*, 2011).

Selon divers rapports, un large éventail d'activités biologiques a été attribué au complexe de cuivre, en l'occurrence les activités antibactérienne (MORE *et al.*, 2002 ; FIORAVANTI *et al.*, 1995), antifongique (HOSSAIN *et al.*, 1996; ANGEL *et al.*, 2012) , antioxydante (LI-HUA *et al.*, 2013) et anticancéreuse (BARVE *et al.*, 2006 ; SANTINI *et al.*, 2014). Ces dernières années, les dérivés de cuivre et des ligands auxiliaires se sont révélés comme agents antimicrobiens potentiels par rapport au système mono-ligand (MAHALAKSHIM ET RAMAN., 2013) en raison de leur comportement de liaison avec l'ADN,

La bioactivité de ces complexes a été analysée sur les bactéries à Gram positif et à Gram négatif, ainsi que des souches fongiques. En outre l'interaction des complexes de cuivre avec l'ADN a également été étudiée pour obtenir des fonctionnalités supplémentaires de leurs modes de liaison (ZHANG *et al.*, 2004).

Les complexes peuvent présenter une activité nucléase seulement en présence de peroxyde d'hydrogène, ce qui indique que le clivage de l'ADN est induit soit par des groupes hydroxyle ou par des radicaux d'oxygène (DONG *et al.*, 2010 ; MASSOUD *et al.*, 2011).

L'activité d'inhibition de la croissance bactérienne des ligands liés au métal pourrait être due à leur capacité de chélation. Le comportement redox de l'ion de cuivre (Cu^{2+}) dans les complexes peut également s'ajouter à l'activité antimicrobienne (OSUNLAJA *et al.*, 2009).

5-Mécanismes d'action des acides organiques

Grâce à la production d'acides organiques, les bactéries lactiques diminuent le pH du milieu dans lequel elles se multiplient en inhibant une partie de la flore qui s'y développe. Outre la diminution du pH du milieu, l'effet antagoniste des acides organiques résulte de l'action de leur forme non dissociée. En effet, la forme non dissociée de l'acide peut traverser passivement la membrane et acidifier le cytoplasme par libération du proton, ce qui affecte le métabolisme cellulaire en inhibant certaines fonctions (KLAENHAMMER, 1993; BRUL *et al.*, 1999).

L'ajout d'acide provoque une diminution du pH externe qui va entraîner une baisse du pH interne des micro-organismes et ainsi inhiber leur développement. Mais, tous les microorganismes n'ont pas la même sensibilité au pH. Le pH interne varie d'un micro-organisme à l'autre (6,5 pour les acidophiles à 9 pour certains alcalophiles), ainsi, certains micro-organismes comme les bactéries fermentaires par exemple supportent de plus grandes variations de pH interne que d'autres. Chaque micro-organisme est caractérisé par un seuil de pH en dessous duquel il ne se développe pas. Quelques exemples de pH minimum de micro-

organismes sont indiqués dans le Tableau 6, il apparaît ainsi que les levures et les moisissures résistent plus à l'acidité que les bactéries (CHENE, 2002).

Tableau 06: pH minimum de quelques microorganismes :

Micro-organismes	pH minimum
<i>Pseudomonas sp.</i>	5,6
<i>Campylobacter jejuni</i>	4,9
<i>Salmonella sp.</i>	4
<i>Escherichia coli</i>	4,4
<i>Enterococcus faecalis</i>	4,4
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	5,2
<i>Clostridium perfringens</i>	5
<i>Lactobacillus</i>	3,8
<i>Listeria sp.</i>	4,3
Levures en général	2,4
Moisissures en général	2

En général, les propriétés antimicrobiennes du vinaigre et du jus de citron sont attribuées respectivement à leur teneur en acide acétique et en acide citrique (YANG *et al.*, 2009). On suppose que ces acides organiques traversent la membrane cellulaire des bactéries et que la libération de protons (H^+) dans les cellules entraîne leur mort. Comme la croissance de nombreux organismes pathogènes est inhibée lorsque le pH du milieu est inférieur à 4,6, ces acides organiques, dont le pH est de 2 à 3 sont souvent ajoutés aux aliments comme conservateurs (BJORNSDOTTIR *et al.*, 2006).

En général, les bactéries à Gram négatif comme *Shigella sonnei*, *Salmonella spp.*, *E. coli*, *P. aeruginosa* et *Yersinia enterocolitica* sont plus sensibles aux acides organiques (acide acétique, acide citrique) que les bactéries à Gram positif comme *S. aureus* et *L. monocytogenes*. Les parois cellulaires très réticulées des bactéries à Gram positif réduiraient

la diffusion des acides organiques dans la cellule et limiteraient ainsi leur action antimicrobienne (MCKEE *et al.*, 2005).

6-Mode d'action des antibiotiques

Comme le montre la Figure 12, les antibiotiques peuvent à différents niveaux de la cellule bactérienne, comme la paroi, la membrane, les acides nucléiques, etc.

6-1- Antibiotiques agissant au niveau de la paroi bactérienne

Les β -lactamines ont un mécanisme d'action identique, elles inhibent la synthèse du peptidoglycane de la paroi bactérienne en se fixant de façon covalente sur certaines enzymes responsables de la transpeptidation, étape essentielle de la synthèse du peptidoglycane, les empêchant ainsi d'assurer leurs fonctions (CAVALLO *et al.*, 2004).

L'activité enzymatique est inhibée par liaison avec les β -lactamine. Les β -lactamines ont un effet bactéricide sur les bactéries en voie de croissance. Il existe de nombreuses variétés de β -lactamine qui se distinguent par leur spectre et leur propriété pharmacologique (NORDMAN, 2000).

6-2- Antibiotiques agissant sur les membranes

Les polymyxines se fixent sur les membranaires bactériennes et les désorganisent. (SINGLETON, 2005).

Les nitrofuranes sont des produits à large spectre, la nitrofurantoïne est utilisée exclusivement dans les infections urinaires (NAUCIEL, 2000).

6-3- Antibiotique inhibant la synthèse protéique

Les aminosides sont des inhibiteurs de la synthèse des protéines qui exercent des effets pléiotropes sur la bactérie, ce sont des antibiotiques bactéricides. Ils inhibent la traduction aux stades d'initiation, d'élongation et de terminaison. Leur cible est l'ARN 16S du ribosome bactérien. (LAMBERT, 2006).

6-4 Antibiotique se fixant sur la sous unité 50s du ribosome

Le chloramphénicol un antibiotique à large spectre, se fixant sur la sous unité 50s du ribosome de la bactérie cible (SINGLETON, 2005).

6-5- Antibiotiques agissant sur les acides nucléiques :

Les sulfamides sont des analogue de l'acide para-amino-benzoïque. Ils inhibent la synthèse des folates en inhibant la dihydroptérate synthétase, d'où leur action sur la synthèse d'acides nucléiques (SINGLETON, 2005).

Les quinolones inhibent des topoisomérase, enzymes intervenant dans la conformation de l'ADN et plus particulièrement la topoisomérase 2 romain (ou ADNgyrase) et la topoisomérase 5 (JACOB *et al.* , 2003).

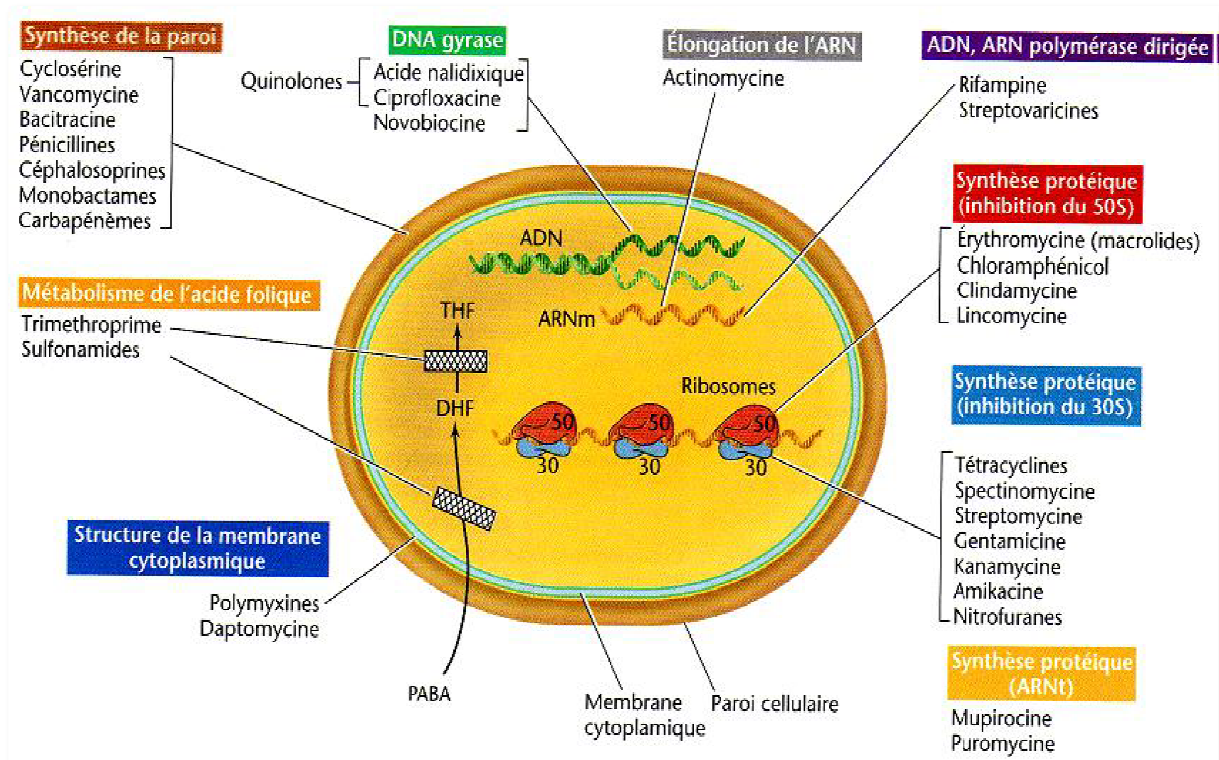


Figure 11 : Mécanismes d'action des agents majeurs chimio thérapeutiques antibactériens.

(MADIGAN ET MARTINKO, 2007).

1-Applications industrielles des huiles essentielles

Les huiles essentielles de par leurs propriétés nombreuses et variées sont utilisées dans différents secteurs : en parfumerie, en cosmétologie, en conserverie et dans les industries pharmaceutiques (ROTA *et al.*, 2008).

1-1-Application en industrie alimentaire

En industrie alimentaire, on recherche toujours une conservation saine et de longue durée pour les produits alimentaires, ainsi qu'une meilleure qualité organoleptique. L'addition d'huile essentielle est opérée dans le but de rehausser le goût et empêcher le développement des contaminants alimentaires microbiens (BILGRAMI *et al.*, 1992).

Les plantes aromatiques, les épices et leurs huiles essentielles sont utilisées depuis des siècles dans la préparation alimentaire non seulement pour la flaveur qu'elles apportent, mais aussi comme conservateurs, pour empêcher le développement des contaminants alimentaires. (MEBARKI, 2010).

T. vulgaris est une des plantes les plus populaires, elle est utilisée dans le monde entier, ses applications sont très vastes et touchent le domaine alimentaire et celui de la médecine traditionnelle, de plus son huile essentielle est utilisée dans les industries alimentaire, pharmaceutique et cosmétique (JORDAN *et al.*, 2006).

Ainsi, les huiles essentielles, actuellement employées comme arômes alimentaires sont également connues pour posséder des activités antimicrobiennes et pourraient donc servir d'agents de conservation alimentaires, ou approuvés comme additifs alimentaires par la Food and Drug administration. Ils n'ont, par conséquent, pas besoin d'autorisation d'emploi dans les aliments ; cependant, des études préalables sont nécessaires afin de mieux cerner leur activité antimicrobienne.

Des études récentes ont démontré que l'huile essentielle de dictame (*dictamnus de origanum*) est un inhibiteur de croissance remarquable contre les microorganismes. Il possède également une activité antioxydante significative. Cette huile essentielle peut représenter une source efficace et peut coûteuse en puissants agents antimicrobiens naturels ayant des propriétés favorables à la santé et qui peuvent être incorporés dans des systèmes alimentaires (MITROPOULO *et al.*, 2015).

Parmi le groupe diversifié des constituants chimiques des huiles essentielles, le carvacrol, qui exerce une action antimicrobienne bien distinguée, il est additionné à différents produits alimentaires en industrie agro-alimentaire (HAMMER *et al.*, 1999).

Plusieurs travaux ont montré que les huiles essentielles de thym, d'origan, de cannelle et d'autres plantes aromatiques ont un effet inhibiteur sur la croissance et la toxinogénèse de plusieurs bactéries et champignons responsables de toxi-infections alimentaires (RHAYOUR, 2002).

Elles sont aussi utilisées dans les préparations culinaires, assaisonnement à huile végétale additionnée d'huile essentielle (thym, basilic, romarin, origan), parfum de desserts (huile essentielle d'agrumes, vanille.etc.) (DEGRYSE *et al.*, 2008). De même, elles sont ajoutées aux pâtisseries, condiments, et aux boissons gazeuses ou alcooliques. elles sont également utilisées dans les emballages de conservation des denrées alimentaires (TURGEON, 2001; BAKKALI *et al.*, 2008).

Les huiles essentielles de *Nigella sativa*, *Artémisia herba alba*, et *Mentha pulégium* procurent une protection prometteuse contre les phénomènes oxydatifs dans la viande de poulet ce qui assure une préservation effective de ses qualités organoleptiques (couleur et flaveur) durant le stockage. De même, ces huiles ont aussi permis de prolonger de six jours la durée de conservation de la viande en exerçant une importante activité antibactérienne vis à vis de la flore psychrotrophe aérobie totale, ce qui conduit à un ralentissement significatif des phénomènes d'altération (LEFSIH *et al.*, 2006).

Les huiles essentielles de citron et de petit grain du bigaradier ont fait preuve d'une excellente activité antibactérienne vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et ce pouvoir a été maintenu lors de la conservation de la sardine (KESSACI *et al.*, 2009).

Une nouvelle technique pour réduire la prolifération des micro-organismes réside dans l'utilisation des huiles essentielles de plantes aromatiques permettant une bonne conservation des denrées alimentaires (LIS-BALCHIN *ET al.*, 1998).

Plusieurs travaux ont montré que les huiles essentielles de genévrier, de cannelle, de romarin, de clou de girofle et d'autres plantes aromatiques ont un effet inhibiteur sur la croissance et la toxinogénèse de plusieurs bactéries et champignons responsables de toxi-infections alimentaires (VALERO ET FRANCES., 2006).

1-2-Application des HE's dans la désinfection des locaux

Grâce à leur pouvoir antiseptique, les huiles essentielles peuvent permettre d'assainir l'air ambiant ou du système de ventilation, notamment dans le milieu hospitalier, entraînant un effet bénéfique au niveau de la qualité de l'air et limitant aussi la propagation des germes microbiens (BILLERBECK, 2007).

L'huile de thym est un produit naturel et écologique utilisé comme substance active dans plusieurs produits désinfectants homologués par Santé Canada. Sa faible toxicité orale et cutanée lui permet d'être classée comme «pesticide à risque minimum». Certains produits homologués à base de thymol désinfectent les surfaces sans nécessiter de rinçage ou d'essuyage et peuvent s'utiliser sans dilution en toute sécurité.

L'huile essentielle extraite du sapin baumier est un excellent antiseptique atmosphérique par diffusion. Elle permet de purifier, d'aromatiser l'air et de se prémunir ainsi contre les infections.

Le thymol est classé comme sensibilisant et asthmogène par l'Association of Occupational and Environmental Clinics (**AOEC**). Bien que la longueur des temps de contact requis pour obtenir la désinfection voulue (de l'ordre de 10 mn) peut constituer un obstacle à son emploi dans les applications à grande échelle.

1-3-Application des HE en cosmétique

Un grand nombre d'HE's est utilisé dans l'élaboration de la majorité des parfums et produits de toilette. Ces essences servent à préserver les cosmétiques grâce à leur activité antiseptique tout en leur assurant une odeur agréable (ROULIER, 1992). De même, certains constituants chimiques isolés à partir d'HE peuvent faire l'objet de transformations chimiques donnant naissance à de nouvelles odeurs (VIGNE, 1987).

1-4-Utilisation pharmaco-thérapeutique

Depuis longtemps, les huiles essentielles sont utilisées en thérapeutique, leurs applications sont vastes. Elles requièrent de bonnes connaissances de ces substances et le bon fonctionnement du corps humain car si leur pouvoir antiseptique est indiscutable, leur toxicité l'est aussi (MORENO-RODRIGUEZ *et al.*, 2006).

De nombreuses huiles essentielles se trouvent dans différentes préparations pharmaceutiques : sirop, gouttes, gélules, elles rentrent aussi dans la préparation d'infusion telle que : la verveine, thym, menthe et autres (DOMARACKY *et al.*, 2007).

L'origan, la sauge et le thym sont des plantes aromatiques avec usage ornemental, culinaire et phytothérapeutique partout dans le monde. En Europe, ils sont traditionnellement utilisés dans les pays du Sud, en particulier dans la région méditerranéenne. Les activités antimicrobiennes des huiles essentielles dérivées de ces plantes ont attiré l'attention des scientifiques, car elles pourraient être utilisées comme des alternatives à la résistance contre les infections dues aux pathogènes (MITROPOULOU *et al.*, 2015).

La feuille et la sommité fleurie de *T. vulgaris* sont traditionnellement utilisées par voie orale dans le traitement symptomatique de troubles digestifs tels que : ballonnement épigastrique, lenteur de la digestion, éructation, flatulence ainsi que dans le traitement symptomatique de la toux et de la bronchite (BRUNETON, 1999).

Les huiles essentielles ne sont pas seulement utilisées pour traiter les maladies internes et externes (infections d'origine bactérienne ou virale, troubles humoraux ou nerveux) mais aussi en médecine dentaire. Plusieurs huiles essentielles ont produit des effets cliniques très satisfaisants, comme la désinfection de la pulpe dentaire, ainsi que le traitement et la prévention des caries. La listerine qui est une solution constituée d'huile essentielle de thymol et d'eucalyptol possède une grande activité bactéricide sur les microorganismes de la salive et de la plaque dentaire (RHAYOUR, 2002).

Les huiles essentielles de thym et de romarin ont été utilisées pour soulager la fatigue, les maux de tête, les douleurs musculaires et quelques problèmes respiratoires. De même, l'action de géraniol sur les cellules cancéreuses du colon a été déjà montrée (RHAYOUR, 2002).

L'étude réalisée par GIRAUD ROBERT (2007) et qui a été menée chez les patients à peine sortis du bloc opératoire montre l'efficacité de l'effet anti-inflammatoire de HE grâce à leurs propriétés cicatrisantes, réduisant ainsi les suites opératoires de manière immédiate et offrant une évolution et une maturation cicatricielle rapide et optimale.

1-5-Toxicité des huiles essentielles

Les huiles essentielles ne sont pas des produits qui peuvent être utilisés sans risque. Comme tous les produits naturels: "ce n'est pas parce que c'est naturel que c'est sans danger pour l'organisme". Cet aspect des huiles essentielles est d'autant plus important que leur utilisation, de plus en plus populaire, tend à se généraliser avec l'émergence de nouvelles pratiques thérapeutiques telle que l'aromathérapie (PIOCHON, 2008).

Certaines huiles essentielles comme le citron, l'orange amère et la bergamote deviennent sensibilisantes et toxiques seulement sous l'influence de la lumière. De plus, les huiles essentielles contenant des phénols sont toxiques pour le foie (clou de girofle, thym, origan) et celles contenant les cétones, et dans une moindre mesure les lactones sont neurotoxiques (romarin, sarriette, cèdre, camphre, thuya, aneth, hysope) (WILLEM, 2006). Certaines huiles essentielles sont dangereuses lorsqu'elles sont appliquées sur la peau en raison de leur pouvoir irritant (huiles riches en thymol ou en carvacrol), allergène ; huiles riches en cinnamaldéhyde (SMITH *et al.*, 2000).

2. Applications du chitosane

Compte tenu de sa structure chimique, et en mettant à profit ses diverses propriétés spécifiques, le chitosane trouve des applications importantes dans plusieurs domaines (agriculture, santé, environnement,...). Le chitosane s'avère très efficace pour ses effets hypocholestérolémiants, ses actions anti-ulcère, anti-acide, anti-tumorale et immuno-activatrices (SHAHIDI, 2005).

2-1-Application dans le domaine alimentaire

Dans le secteur agroalimentaire, deux principales applications du chitosane sont exploitées. En premier lieu, de par ses propriétés flocculantes, il permet de séparer les particules colloïdales dispersées dans les résidus des industries de transformation. En second lieu, il est utilisé comme matrice pour l'immobilisation d'enzymes ou de cellules microbiennes, animales et végétales (ROLLER ET COVILL, 1999).

Le chitosane et l'huile essentielle de l'origan en combinaison peut réduire le nombre de deux des agents pathogènes *E. coli* et *L. monocytogene* d'origine alimentaire et de la détérioration de la viande de poulet-à-barbecue prêt (SAHRAM, 2015).

La législation relative à l'emploi du chitosane comme agent de biopréservation des aliments est variable en fonction des pays. Il est utilisé au Japon comme conservateur dans de nombreux produits alimentaires (ROLLER *et al.*, 1999; BORDERIAS *et al.*, 2005) et est autorisé comme auxiliaire technologique dans la plupart des pays occidentaux (Europe, Amérique du nord, Australie, Nouvelle- Zélande). Depuis 1983, l'USFDA (United States Food and Drug Administration) a approuvé son utilisation comme additif pour l'alimentation animale (KNORR, 1986).

En France comme en Europe, la réglementation reste encore floue, une demande d'autorisation reste à établir pour sa mise en œuvre comme additif alimentaire (RIVOLIER ET MICHAUD, 2000).

2-2-Application dans le traitement des eaux

Les potentiels environnementaux du chitosane ont suscité un grand nombre de recherches dans le traitement d'assainissement des eaux, dans la réduction de la turbidité et dans la stabilisation des hydrocarbures. Le chitosane permet de traiter les eaux (de rinçage ou résiduelles) chargées en métaux lourds et/ou en métaux précieux de différentes sources, induisant à une diminution globale des coûts opérationnels de l'industrie (TOLAIMATE, 2003).

Les différentes applications du chitosane sont résumées dans le Tableau 7.

Tableau 07 : Différentes application du chitosane (Rinaudo, 2006).

Domaine d'exploitation	Applications
Alimentaire	Hipocholesteromiant Stabilisateur Conservateur
Traitement des eaux	Diminution de la turbidité Dimunition de l'odeur
Agriculture	Stimule la croissance des plantes Libération de fertilisant et de nutriment
Cosmétique	Traitement de l'acné Formulation de shampoing
Biopharmaceutique	Immunostimulant Anticoagulant
Potentiel biomédical	Implant dentaire Reconstitution osseuse

3-Application industrielle de l'acide citrique

Les acides organiques sont des agents classiques de préservation des aliments (BRUL *et al.*, 1999) et sont reconnus comme additifs alimentaires. Les acides couramment utilisés sont les acides benzoïque, sorbique, acétique, fumarique, propionique et lactique. Ils sont utilisés pour prévenir ou retarder la croissance des bactéries dégradant la nourriture (HSIAO *et al.*, 1999).

3-1-Industrie alimentaire

- L'acide citrique est utilisé comme additif (boisson, confiture, etc...) (MEYER *et al.*, 2004). Dans les boissons, il est utilisé en général comme rafraîchissant ou effervescent.
- Dans la fabrication des bonbons, dans la conservation des fruits, de poisson, des glaces, des friandises en général, les sauces, les jus et sirops de fruit, etc ; pendant les vendanges, comme acidifiant du goût;
- Il peut être utilisé comme agent nettoyant de l'acier inoxydable en raison de son pouvoir séquestrant; (AGROVIN., 2012) ;
- Dans celle des plastiques sous la forme d'esters;
- Dans la purification des métaux grâce à son pouvoir chélatant

3-2-Industrie pharmaceutique

- L'acide citrique favorise indirectement la croissance des os en facilitant l'assimilation du calcium et en régulant la taille des cristaux de calcium dans les os;

- Il est utilisé comme composant de solutions d'irrigation vésicale;
- L'acide citrique et ses sels empêchent une coagulation sanguine du sang conservé;
- Il est utilisé comme solution de rinçage lors de traitements du canal radiculaire en médecine dentaire;
- Dans les poudres et comprimés effervescents, l'effet effervescent est obtenu grâce à l'acide citrique et le bicarbonate de sodium (MEYER, 2004).

4-Comparaison entre deux agents antimicrobiens de substitution

Selon la littérature scientifique, les agents antimicrobiens présentent des avantages et des inconvénients favorisant ou limitant leur utilisation. Le Tableau 8 présente les avantages et les inconvénients industriels de deux agents antimicrobiens.

Tableau 08 : Tableau comparatif des avantages et inconvénients industriels de deux agents antimicrobiens (FONG *et al*, 2011).

Agents	Avantages	Inconvénients
Huile de thym	Produit naturel. • Figure dans la liste des produits généralement reconnus comme inoffensifs (G.R.A.S.) du Code de réglementation fédérale des États-Unis. • Faible toxicité. • Écologique	• Certaines bactéries sont résistantes à l'huile de thym (comme <i>P. aeruginosa</i> ou <i>S. aureus</i>). • Le thymol est classé comme asthmogène par l'Association of Occupational and Environmental Clinics (AOEC). • Coûteux. • Nécessite un temps de contact élevé .
Vinaigre (acide acétique), jus de citron (acide citrique)	Produits naturels. • Faciles à obtenir et abondants. • Faible toxicité	Efficacité antimicrobienne limitée et spectre étroit. • Peuvent détériorer les propriétés organoleptiques des produits. • Peuvent être corrosif ou irritant. • Odeurs fortes et indésirables. • Les mélanges d'acides et d'eau de Javel peuvent dégager du chlore gazeux.

Partie II

Etude expérimentale

1. Matériel

1.1. Souches microbiennes

Afin d'évaluer aussi bien l'effet antibactérien que l'effet antifongique des substances à tester, différentes souches microbiennes de référence ont été choisies comme cibles pour mener le test d'activité antimicrobienne. Il s'agit de deux souches bactériennes (à Gram+ et à Gram-) et deux souches fongiques (une levure et une moisissure). Les souches bactériennes sont *Bacillus cereus* ATCC 6633 et *Escherichia coli* ATCC8739, choisies pour leur pathogénécité et leurs résistances aux antibiotiques, ainsi que leur implication dans les intoxications alimentaires. Elles ont été aimablement fournies par le laboratoire de microbiologie de la société pharmaceutique (Aldaph-Novonordisk) sise à la zone industrielle Oued-Aissi de Tizi-Ouzou.

Les souches fongiques utilisées dans cette étude appartiennent aux espèces *Candida albicans* et *Aspergillus niger*. La levure provient d'un prélèvement vulvaire effectué au laboratoire de mycologie du CHU Nedir Mohammed de Tizi ousou, alors que la moisissure a été isolée d'une variété de blé dur (vitron) au département des sciences biologiques et des sciences agronomiques de l'université de Laghouat.

1.2. Milieux de cultures solides

- Muller Hinton
- Sabouraud

1.3. Solution et tampon

- DMSO : Diméthylsulfoxyde C'est un liquide organique hautement polaire et miscible à l'eau. Il est essentiellement inodore et possède un faible degré de toxicité

Permet de mélanger deux liquides non-miscibles grâce à un tensioactif en dispersant l'un dans le second sous forme de micelles.

- Eau physiologique : 10g (sel)/L
- Eau distillé
- Huile essentielle de thym
- Acide citrique
- Composés complexes de métaux de transition et d'acides aminés
- Chitosane en solution

1.4. Disque d'antibiotiques

Le disque utilisé comme témoin positif contre *Bacillus cereus* et *Escherichia coli* est imprégné de l'antibiotique aminopeniciline (Augmentin).

1.5. Huile essentielle utilisée

L'huile essentielle testée durant notre étude est une huile commerciale (THILL-S NR1, SDZ), issue d'une plante appartenant à la famille des lamiacées, il s'agit de *Thymus vulgaris*.

Elle est 100% pure et naturelle issue de l'agriculture biologique, achetée à la société française FLORAME, elle a été conservée en position verticale, à l'obscurité et au frais (réfrigération) certifiée par Ecocert SAS F 32600(ISO).

Le profil chromatographique de l'huile essentielle de thym telle que déterminée par le fournisseur commercial est illustré dans le Tableau 9

Tableau 09 : Profil chromatographique de l'huile essentielle de *thymus vulgaris*

Temps de rétention (min)	Identification	Aire (%)
5.163	Tricyclène	0.05
5.277	α -Thuyène	1.08
5.473	α - Pinène	1.08
5.896	Camphène	0.78
6.758	$\square$ -Pinène	0.40
7.068	3-Octanone	0.09
7.239	Myrcène	1.70
7.720	α - Phellandrène	0.22
8.196	α - Terpinène	1.85
8.611	<i>p</i> -Cymène	18.82
8.715	Limonène*	1.12
	1,8-Cinéole	
9.515	cis- $\square$ - Ocimène	0.05
10.030	$\square$ - Terpinène	9.52
10.354	trans -4-Thujanol	0.61
10.587	Oxyde de linalol	0.07
11.320	Terpinolène	0.38

11.825	Cis 4-Thujanol	0.13
12.049	Linalol*	5.68
14.106	Camphre	0.40
15.354	Bornéol	1.90
15.996	Terpinèn-4-ol	1.07
16.887	α - Terpinéol	0.11
18.801	Acétate de bornyle	0.12
19.906	Thymol méthyl éther	0.47
22.820	Carvacrol méthyl éther	0.24
23.554	Thymol	45.85
23.863	Isothymol (Carvacrol)	3.17
30.140	β -Caryophyllène	1.54
31.263	Alloaromadendrène	0.16
34.621	Lédène	0.12
36.368	γ -Cadinène	0.14
39.525	Oxyde de caryophyllène	0.25

Propriétés organoleptiques

Aspect : Liquide limpide, mobile, jaune brun, à odeur caractéristique

Couleur : jaune claire

Odeur : puissante, typique de l'herbe aromatique.

Indice de Réfraction (20°C): 1,496

Densité (20°C): 0,919

2. Méthodes

2.1. Lieu d'étude

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de microbiologie du département des sciences agronomiques, faculté des sciences biologiques et des sciences agronomiques, université de Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

2.2. Vérification de la pureté des souches

La pureté des souches microbiennes utilisées a été vérifiée par repiquages successifs des souches bactériennes sur le milieu Müller-Hinton et incubation à 37°C pendant 24 heures.

Le repiquage des souches fongiques a été réalisé sur le milieu Sabouraud et incubation à 25°C pendant 72 heures.

2.3. Conservation des souches

Les souches ont été conservées à 4°C dans des tubes de gélose inclinée ou dans des tubes de gélose profonde préservée au réfrigérateur.

2.4. Observation macroscopique

Après le repiquage de chaque souche, une observation basée sur les critères morphologiques tels que l'aspect des colonies et leur coloration a été effectuée pour vérifier la souche.

2.5. Observation microscopique

L'observation microscopique à l'état frais nous a permis d'observer la morphologie, le regroupement et la mobilité des cellules vivantes :

- Déposer sur une lame une goutte d'eau physiologique stérile ;
- Prélever une fraction de culture et l'incorporer à la goutte d'eau ;
- Recouvrir d'une lamelle sans enfermer de bulles d'air et sans faire déborder la suspension ;
- Observer à l'objectif x40.

2.6. Coloration de Gram

Préparation des frottis:

- Déposer sur une lame une goutte d'eau physiologique stérile ;
- Prélever stérilement une fraction de culture et l'incorporer à la goutte d'eau pour obtenir une suspension homogène ;
- Sécher et fixer le frottis à la chaleur au-dessus de la flamme du bec bunsen ;
- Recouvrir la lame de violet de Gentiane. Laisser agir 01
- Recouvrir la lame d'une solution de lugol. Laisser agir 1 minute et rincer à la pissette d'eau déminéralisée ;
- Décolorer la lame à l'aide d'éthanol à 95° pendant 5 à 10 secondes et rincer aussitôt à la pissette d'eau déminéralisée ;

- Recouvrir la lame de la fuschine diluée à 1/10. Laisser agir 30 secondes et rincer à la pissette d'eau déminéralisée ;
- Sécher la lame et observer à l'immersion, objectif x100.

La coloration permet de séparer les bactéries en 02 groupes :

- Une coloration en « rose » indique des bactéries « Gram négatives ».
- Une coloration en « violet » indique des bactéries « Gram positives ».

2.7. Préparation des solutions

2.7.1. Préparation des complexes chimiques

Les complexes chimiques à base de ligands ont été préparés au sein du laboratoire de recherche de chimie de coordination, au département de chimie, faculté des sciences, université de Tizi-Ouzou (UMMTO).

Les complexes chimiques ont été conservés sous forme cristalline solide à l'abri de la lumière, ils ne sont pas solubles dans l'eau mais ils sont solubles dans le DMSO. Afin d'obtenir des concentrations assez suffisantes pour provoquer une activité antimicrobienne, les complexes ont été préparés à 10mg/ml (Osunlaja *et al.*, 2001).

Les différents composés ont été pesés à l'aide d'une balance électronique puis dissous dans 3ml de DMSO, l'homogénéisation a été réalisée sur une plaque chauffante dotée d'un agitateur électromagnétique.

Les différents complexes à base d'acide aminés et de métaux de transition utilisés pour la préparation des solutions à tester sont rassemblés dans le tableau 10.

Tableau 10 : Les différents complexes à base d'acide aminé et de métaux de transition :

N° complexe	Complexes chimique	mg/ml	g/mole	Couleur
1	Cu (H ₂ dmg) (arg) (NO ₃) ₂ H ₂ O	10	495.76	Noir
2	Cu (H ₂ dmg) (Arg) (Br) ₂	10	513.56	Olive
3	Cu (Hdmg) ₂ (Glu) (NO ₃)	10	503.56	Noir
4	Cu (Hdmg) ₂ (Glu) (SCN) NO ₃	10	562.71	Maroon
5	Cu(Hdmg) ₂ (Pro) ₂ (NO ₃) ₂ (H ₂ O)	10	570.71	Vert
6	Ni (Hdmg) ₂ (Pro) NO ₃	10	466.88	pourpe

2.7.2. Préparation des solutions de chitosane

Quatre solutions de chitosane différentes ont été préparées en utilisant types de chitosane obtenus par désacétylation (NaOH à 40%, 120°C) de la chitine pendant quatre périodes différentes : 1H30, 2H00, 2H30 et 3H00.

2.7.3. Dilution de l'huile essentielle de thym

La dilution de l'huile essentielle de *T. vulgaris* a été réalisée dans le DMSO, le choix du DMSO comme diluant est basé sur la miscibilité des huiles essentielles à ce dernier et non à l'eau.

Nous avons préparé une série de 5 tubes eppendorfs contenant chacun un volume de DMSO. Pour l'huile à tester, une dilution de 50% de l'huile essentielle a été réalisée en diluant 1ml d'huile essentielle dans le premier tube qui contient 1ml du solvant.

Après une bonne agitation et homogénéisation, nous avons prélevé 1 ml du premier tube que nous avons introduit dans le deuxième tube pour avoir une dilution de 25 %.

De même, nous avons préparé des dilutions de demi en demi, en transférant 1 ml d'un tube à l'autre afin d'obtenir une série de 4 dilutions.

Les différentes dilutions préparées sont présentées dans le Tableau 11

Tableau 11 : Les dilutions de l'huile de thym effectuées dans le DMSO :

Pourcentage de la dilution (%)	50	25	12.5	6.25
HE /DMSO (µl/ml)	500	250	125	625

2.7.4. Préparation des solutions d'acide citrique

L'acide citrique sous forme solide est soluble dans l'eau. Nous avons préparé cinq concentrations différentes dans des tubes propres. .

A l'aide d'une balance électronique, des quantités adéquates d'acide citrique sous forme solide ont été pesées, puis dissoutes chacune dans 100ml d'eau distillé stérile afin d'obtenir les concentrations suivantes :

Tableau 12 : Les concentrations d'acide citrique préparées :

Pourcentage (%)	3	4	6	8	10
AC/Eau distillée (g/100ml)	3g/100ml	4g/100ml	6g/100ml	8g/100ml	10g/100ml

2.7.5. Préparation des suspensions bactériennes

A partir d'une culture de 18h, la suspension est calibrée pour avoir un inoculum de 10^6 ou 10^8 UFC/ml, correspondant à une densité optique (DO) de 0,08 à 0,1 à une longueur d'onde de 630 nm. Une évaluation de DO de la suspension microbienne à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 630 nm a été faite dans le but de standardiser la suspension bactérienne à 10^7 UFC/ml.

2.7.8 Préparation de la suspension fongique

Les spores de jeunes cultures sont récupérées par un lavage des boîtes de Pétri, avec un volume de 9ml d'eau physiologique stérile. Après une bonne agitation permettant une répartition homogène des spores dans l'eau physiologique, nous avons procédé à un comptage des spores à l'aide d'une cellule de Thoma au microscope dans le but de standardiser la suspension microbienne à 10^8 spores/ml.

Le comptage des cellules se fait sous microscope à l'aide d'une cellule de Thoma. Une goutte de suspension est déposée entre lame et lamelle. Le comptage du nombre de cellules par carré moyen se fait en respectant les caractéristiques de la lame utilisée par le protocole du fer à cheval. Le but de ce comptage est de mesurer le nombre de cellules en ml, si le nombre de spores dépasse 10^8 UFC/ml, nous procédons à des dilutions avec de l'eau distillée stérile.

2.8. Test de l'activité antimicrobienne des agents antimicrobiens

2.8.1. Méthode des disques

Dans cette méthode, un tapis de la souche indicatrice est réalisé sur la surface d'un milieu solide, ensuite des disques d'antibiotiques ou des autres agents antimicrobiens sont déposés sur le tapis bactérien. Après incubation, les boîtes sont examinées pour la présence des zones d'inhibition (BERECKA *et al.*, 2009).

2.8.2. Méthode des Puits

Cette méthode, telle que décrite par BERGHE ET VLIETINCK (1991), consiste à inoculer, par inondation ou en profondeur avec une dilution adéquate (suspension microbienne), un milieu coulé dans une boîte de Pétri sur une épaisseur de 8 mm, et à réaliser des puits de 6 mm de diamètre de manière concentrique qui seront remplis de 50 μ l de la solution à base d'agent antimicrobien tester.

Après une pré-diffusion de 45 mn à température ambiante, les souches sont incubées à 35°C pendant 24 heures pour les bactéries et 25°C pendant 48 heures pour les levures et

moisissure. A la fin de l'incubation, les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés à l'aide d'un pied à coulisse (KUETE *et al.*, 2004).

Cette méthode assure une diffusion radiale de l'agent antimicrobien à partir d'un puits en donnant une zone d'inhibition claire et facilement mesurable. L'agent diffuse radialement et crée une zone d'inhibition circulaire à la surface de la gélose préalablement ensemencée avec la suspension bactérienne (DORMAN ET DEANS, 2000).

La gélose Muller Hinton a été coulée dans des boîtes de Pétri préalablement ensemencée de 1 ml à partir d'une suspension bactérienne de 10^7 UFC/ml puis la suspension a été homogénéisée avec des mouvements circulaires avant la solidification de la gélose.

Pour les champignons et levures, après avoir coulé la gélose Sabouraud dans les boîtes de Pétri, environ 60 μ l de la suspension fongique ont été étalés en surface de la gélose et solidifiés à l'aide d'un râteau.

Les puits sont imprégnés de 50 μ l de l'agent antimicrobien. Un témoin négatif est aussi réalisé avec le DMSO afin d'écarter son effet.

Les boîtes sont maintenues à température ambiante pendant 30 mn pour permettre la diffusion de l'agent antimicrobien, puis elles sont incubées à 35°C/24h pour les bactéries, 25°C/72h pour les levures et moisissures.

La lecture des résultats se fait en mesurant les diamètres de la zone d'inhibition autour des puits.

2.8.3. Méthode des spots

Elle consiste à couler 8 mm de gélose liquéfiée sur une boîte de Pétri suivie d'une deuxième couche de gélose (3 ml), cette dernière a été homogénéisée avec la substance antimicrobienne à des concentrations différentes.

Une culture fraîche de la souche test est ensuite ensemencée sur ce tapis sous forme de spots. Après incubation, les boîtes sont examinées. L'inhibition ou la densité du tapis cellulaire est un facteur déterminant la CMI dans cette méthode (TAGG *et al.*, 1976; RILEY ET CHAVAN, 2007).

Après une incubation, la détermination de la CMI est basée sur l'observation de la présence ou non d'une croissance microbienne. L'absence d'une croissance indique une inhibition du développement microbien.

2.8.3.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI), bactéricide (CMB) et fongicide (CMF):

La concentration minimale inhibitrice (CMI) correspond à la plus petite concentration de la substance antimicrobienne pour laquelle aucune croissance microbienne n'est observée après 24h pour les bactéries et après 48h pour les levures et moisissures (MARTINI ET ELOFF, 1998).

La concentration minimale bactéricide (CMB) ou fongicide (CMF) correspond à la plus faible concentration en agent antimicrobien capable de tuer plus de 99,99 % de l'inoculum microbien initial (soit moins de 0,01 % de survivants) (DEGRYSE, 2008).

La concentration minimale létale (bactéricide ou fongicide) est déterminée par un repiquage d'un inoculum à partir des boîtes de la CMI sur un milieu gélosé. Après une incubation à 30°C pendant trois jours, la CMB/CMF est déterminée par l'observation de la présence ou non d'une subcroissance microbienne. La CMB/CMF correspond à la plus petite concentration de l'agent antimicrobien testée pour laquelle aucune subcroissance n'a été observée.

2.9. Association des agents antimicrobiens

D'après PIBIRI (2005), les effets des combinaisons d'agents antimicrobiens, sont définis selon quatre interactions possibles : Indifférence, Addition, Synergie et Antagonisme.

Après avoir sélectionné les agents antimicrobiens qui ont un effet inhibiteur, nous avons effectué des combinaisons entre ces agents par la méthode des puits.

Les différentes combinaisons d'agents antimicrobiens consistent à fusionner :

1. l'huile de thym (diluée à différentes concentrations) avec l'acide citrique ;
2. l'huile de thym (diluée à différentes concentrations) avec le complexe chimique ;
3. l'acide citrique avec le complexe chimique.

A l'aide d'une micropipette, les puits ont été remplis de 50ul du mélange de deux agents antimicrobiens à partir d'un eppendorfs où on a mélangé les différents agents (25ul de chacun). Après incubation, le diamètre des zones d'inhibition a été mesuré et comparé aux diamètres des zones d'inhibitions des agents antimicrobiens testés seuls précédemment.

Parti III

Résultats et discussion

1. Vérification des souches de référence

Les souches bactériennes et fongiques ayant servi pour les tests d'activité antimicrobienne ont été vérifiées par des observations macroscopique et microscopique.

Les Tableaux 13 et 14 rapportent les résultats des observations microscopiques et macroscopiques des microorganismes étudiés :

Tableau 13 : Résultats des observations microscopiques à l'état frais et après coloration de Gram de *E. coli* et *B. cereus*

Identification	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>
Etat frais	Coccobacille mobile	Mobile Bacille
Après coloration de Gram	Gram négatif	Gram positif

Tableau 14: Résultats des observations microscopiques à l'état frais de *C. albicans* et *A. niger*.

Identification	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>
Etat frais	Colonies de forme ovoïde immobile avec des bourgeons et des filaments	Présence de filaments hyalins cloisonnés
Caractères cultureux	Colonies blanches, lisses, et peuvent se plisser en vieillissant	Apparition de colonies d'aspect poudreux veloutés et de couleur noire sur milieu de Sabouraud.

Les observations microscopiques et macroscopiques faites ne relèvent aucun doute sur la nature et la pureté des souches utilisées dans les tests.

2- Evaluation de l'activité antimicrobienne

L'action antimicrobienne se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour des puits imprégné de l'agent antimicrobien étudié. Le diamètre des zones d'inhibition autour des puits détermine l'action antimicrobienne.

Selon les intervalles des zones d'inhibition établis par DE BILLERBECK (2007), l'activité antimicrobienne des extraits ou des composés purs est classée selon le diamètre de la zone d'inhibition ($\varnothing$) comme suit :

- Souche résistante ($\varnothing < 6$ mm)
- Souche intermédiaire ($\varnothing < 13$ mm)
- Souche sensible ($\varnothing > 13$ mm)

2.1. Effet du DMSO sur les souches testées

Les résultats obtenus après incubation ont permis de constater que les boîtes de Pétri contenant des puits imprégnés de DMSO ne montrent aucune zone d'inhibition de la croissance microbienne, ce qui indique donc l'absence totale de l'effet inhibiteur du DMSO interférant dans l'action des différents agents antimicrobiens. Ainsi, l'effet antimicrobien additionnel éventuel du DMSO se trouvant dans les échantillons serait nul.



Figure 12 : Photo montrant l'effet du DMSO sur la bactérie (*Bacillus cereus*)

2.2. Effet de l'huile essentielle de *T. vulgaris* sur les différentes souches microbiennes

Les résultats montrant les diamètres des zones d'inhibition (mm) en fonction des concentrations de l'HE de *T. vulgaris* sont présentés dans la Figure 13.

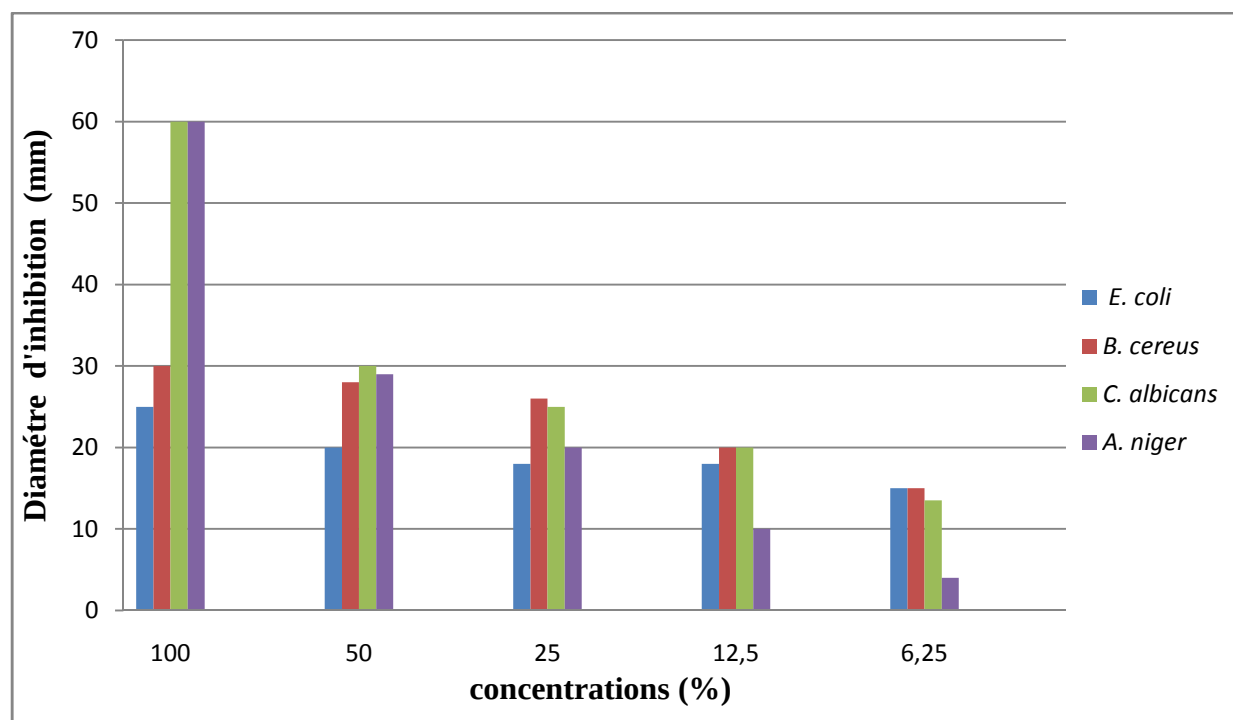


Figure 13 : Représentation graphique de l'effet de l'huile de *T. vulgaris* sur les souches testées

Les résultats expérimentaux (Figure 13) montrent que toutes les souches testées sont sensibles à l'effet inhibiteur d'HE de *T. vulgaris* utilisé à l'état pur (100%) ou diluée à différentes concentrations.

Cependant, l'effet inhibiteur de cette huile sur la croissance microbienne observées est variable selon la souche considérée, les diamètres d'inhibition varient de 15 à 30 mm pour les souches bactériennes (*E. coli* et *B. cereus*) est de 6 à 60 mm pour les souches fongiques (*C. albicans* et *A. niger*).

La comparaison des diamètres de la zone d'inhibition obtenus avec *B. cereus* (15 à 30 mm) et *E. coli* (15 à 25 mm) permet de relever une différence de 5 mm, ceci permet d'affirmer la sensibilité plus élevée de *B. cereus* par rapport à *E. coli*. Ces observations ont été déjà rapportées par BOUHADID *et al* (2006) qui ont montré que les huiles essentielles de *T. vulgaris thymolifrum* et *corydothymus capitatus* exercent une activité antibactérienne plus intense surtout contre les bactéries Gram+.

L'effet inhibiteur maximal sur les bactéries est obtenu avec l'huile pure, soit une valeur maximale de 30 mm (*B.cereus*) et de 25 mm (*E. coli*). Si cet effet semble diminuer progressivement lorsque la concentration de l'HE baisse, les diamètres d'inhibition sont constamment supérieurs à 13 mm, ce qui indique que l'huile demeure systématiquement efficace révélant ainsi son fort pouvoir antimicrobien. Selon BURT ET MAYAUD (2008),

aux concentrations de 0,1 à 0,6% (v/v), l'huile de thym est capable d'inhiber la croissance de plusieurs microorganismes tels que *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*; cependant, elle ne devient bactériostatique contre *Pseudomonas aeruginosa* qu'à des concentrations beaucoup plus élevées (de 2 à 10%).

L'huile de thym est aussi efficace sur les souches fongiques que sur les souches bactériennes, ainsi nous avons observé des zones d'inhibition de l'ordre de 60 mm produites par l'huile pure testée sur *C. albicans* et *A. niger*, il s'agit dans ce cas d'une inhibition totale sur toute la surface de la boîte de Pétri. Cependant, les diamètres baissent avec la diminution de la concentration de l'huile de thym (dilution).

Seul *A. niger* montre un diamètre d'inhibition inférieur à 13mm à la concentration 6.25 %, la souche fongique semble être la plus résistante à de grandes dilutions. .

Par contre, *C. albicans* semble plus sensible à l'effet de l'huile par rapport à *A. niger* en exhibant des zones d'inhibition moins importantes.



Figure 14: Photos montrant les zones d'inhibition de la croissance bactérienne en présence de l'huile de *T. vulgaris*. (A) *E. coli* ; (B) *B. cereus*

Ces résultats concordent avec ceux rapportés dans la littérature scientifique stipulant que le type de microorganisme ciblé est un paramètre important déterminant l'activité antimicrobienne des huiles essentielles. En général, les différents microorganismes n'ont pas une sensibilité similaire vis à vis des huiles essentielles. Entre autres, les microorganismes les plus étudiés sont *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* (Gram+), *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-), *Candida albicans* (Levures) et *Aspergillus niger* (champignons) (MALCKY, 2006).

Il a été rapporté que le pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle de thym est du à l'action fortement inhibitrice de ses deux principaux composants, le thymol et le carvacrol (BURT, 2007).

En effet, des études réalisées *in vitro* et *in vivo* ont démontré que les huiles essentielles de *T. vulgaris* à chémotype thymol surtout, possèdent des propriétés antifongiques contre un certain nombre de mycètes. A titre d'exemple, une étude menée par REDDY *et al.*, (1998) sur *Botrytis cinerea* et *Rhizopus stolonijer* a révélé le potentiel antifongique élevé de l'huile essentielle de *T. vulgaris*, considérant ainsi l'huile essentielle comme agent protecteur du fruit de la fraise (*Fragaria ananassa*) contre la détérioration causée par les mycètes testés.

S'agissant de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de thym, MILADINOVIC *et al.*, (2015) ont rapporté que cette huile exhibe effectivement une activité antibactérienne *in vitro* contre toutes les souches bactériennes testées, ceci indique également le pouvoir antibactérien redoutable de cette huile essentielle.

BOUHDID *et al.*, (2006) ont évalué le pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle de *T. vulgaris* à chémotype thymol (36.58%), sur plusieurs souches notamment *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, les diamètres des zones d'inhibition rapportés par ces auteurs sont 8.0 mm, 20.0 mm, et 22.0 mm respectivement.

Outre l'huile de thym, OULHADJ *et al.*, (2011) ont souligné que l'activité antifongique de l'huile essentielle du myrte peut être due à ses constituants majoritaires: cinéol (éther), α -pinène et limonène (monoterpènes) mais aussi à ses constituants minoritaires: Myrténol, Linalol, Géraniol (alcools terpéniques) et l'Eugénol (phénol). Certains champignons sont plus résistants à l'huile de genévrier que les bactéries (CHAO *et al.*, 2000).

Nos résultats montrent que les champignons et les levures ont une sensibilité supérieure par rapport aux bactéries et parmi les bactéries cmm preuve, les Gram – apparaissent plus résistantes que les Gram + vis-à-vis de cette huile essentielle, ces résultats sont donc en accord avec ceux obtenus par COX *et al.*, (2000); AMARAL *et al.*, (1998).

PINTO *et al.*, (2006) ont rapporté que les espèces végétales du genre *Thymus vulgaris* et *Thymus zygis* qui contiennent d'importantes quantités de phénols dont le thymol et le carvacrol présentent une large activité antimicrobienne.

Il a été démontré que le thymol et le carvacrol augmentent la perméabilité de la membrane cellulaire des bactéries, ils réduisent la force proto-motrice et diminuent ainsi le taux intracellulaire d'adénosine triphosphate, ou ATP ULTEE, (1999); FONG *et al.*, (2011).

En général, les bactéries Gram- sont plus résistantes que les Gram+ grâce à la structure de leur membrane externe. Ainsi, la membrane extérieure des Gram- est plus riche en lipo-

polysaccharides et en protéines que ceux de Gram+ qui la rend plus hydrophile, ce qui empêche les terpènes hydrophobes d'y adhérer. Néanmoins, certains composés phénoliques à bas poids moléculaire comme le thymol et le carvacrol peuvent adhérer à ces bactéries par fixation aux protéines et aux lipo-polysaccharides membranaires grâce à leurs groupes fonctionnels et atteindre ainsi la membrane intérieure qui est plus vulnérable (DORMAN ET DEANS, 2000).

Dans une étude publiée par EVANDROS *et al.*, (2005), les effets du carvacrol, (+) carvone, thymol et trans-cynnamaldehyde ont été évalués sur *E. coli* O157:H7 et *Salmonella thyphimurium*, les résultats ont montré que carvacrol et thymol agissaient en diminuant le contenu intracellulaire en ATP des cellules de *E. coli*, tandis que simultanément l'ATP extracellulaire augmente. Ceci indique une action perturbatrice de ces composants vis-à-vis de la membrane cytoplasmique.

Cependant, seulement peu d'études ont porté sur les mécanismes d'action (RHAYOUR, 2002). Certains auteurs ont démontré que l'intensité de l'action des huiles essentielles varie selon leur chémotype, et que le mode d'action est lié principalement au profil chimique des constituants de chaque huile essentielle qui est très diversifié (COX *et al.*, 2000). Au contraire, d'autres travaux ont montré qu'il n'y a aucune corrélation entre les constituants majeurs d'une huile essentielle et l'effet antimicrobien (CIMANGA *et al.*, 2002).

Jusqu'à présent, il n'existe pas d'étude qui puisse élucider de façon claire et précise le mode d'action des huiles essentielles étant donné la complexité de leur composition chimique, il est probable que chacun des constituants des huiles essentielles ait son propre mode d'action (MANSOUR *et al.*, 2010).

D'après ELKALAMOUNI (2010), les HE's agissent en empêchant la multiplication des bactéries, leur sporulation et la synthèse de leurs toxines. Pour les levures, elles agissent sur la biomasse et la production du pseudo mycéliums alors qu'elles inhibent la germination des spores, l'élongation du mycélium, la sporulation et la production de toxines chez les moisissures.

De même, RANDRIANARIVELO (2008) a rapporté que les constituants minoritaires sont également connus pour leur activité antimicrobienne. En effet, les alcools, les aldéhydes et les esters peuvent contribuer à l'effet antimicrobien global des huiles essentielles (DERWICH *et al.*, 2010).

KALEMBA ET KUNICKA (2003) ont démontré que la structure moléculaire joue un rôle important, comme la présence d'oxygène dans la molécule de terpène: la caractéristique lipophile du squelette hydrocarboné, ainsi que la propriété hydrophile des groupes

fonctionnels sont déterminants vis-à-vis de l'activité antimicrobienne des terpénoïdes. Sur cette base, l'ordre décroissant de l'activité antimicrobienne de ces composés est le suivant : Phénols> aldéhydes> cétones> alcools> éthers>hydrocarbones.

2.3. Effet de l'acide citrique sur les souches microbiennes

Les résultats de l'évaluation de l'effet antimicrobien de l'acide citrique sur les souches testées sont indiqués dans la Figure 15.

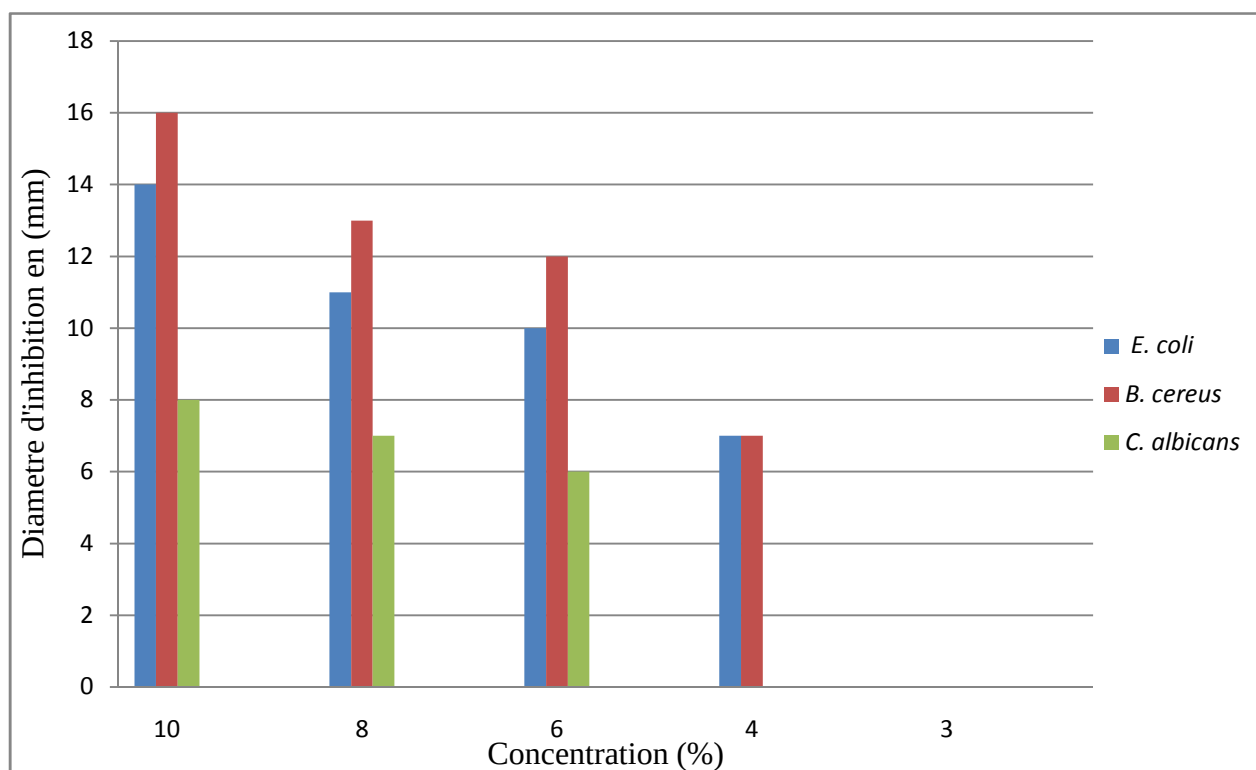


Figure 15 : Représentation graphique de l'effet de l'acide citrique sur les souches microbienne

Nous avons évalué l'effet antimicrobien de l'acide citrique sur toutes les souches bactériennes et sur la levure *Candida albicans*. Les résultats obtenus (Figure 15) indiquent que l'acide citrique à 10% est actif sur les deux souches bactériennes avec des diamètres d'inhibition supérieurs à 13mm, une zone d'inhibition moins importante a été observée chez *C. albicans* pour un diamètre de 8 mm.

Cependant, les souches bactériennes (*E. coli* et *B. cereus*) se sont révélées les plus sensibles, les diamètres étant supérieurs à 12 mm à la concentration de 10% d'acide citrique ($\varnothing$ = 14, 13, respectivement), ce qui montre l'efficacité de cet agent à cette concentration. Par contre, la sensibilité de *C. albicans* est intermédiaire ($\varnothing$ < 13 mm) à 10% d'acide citrique. Lorsque la concentration d'acide citrique est inférieure à 10% la sensibilité des souches

microbiennes baisse progressivement jusqu'à atteindre une valeur nulle à la concentration de 3% d'acide citrique.

De nombreux produits alimentaires se conservent grâce à un pH faible, soit parce qu'ils contiennent naturellement une teneur élevée en acides organiques (par exemples : produits fermentés comme les yaourts, choucroutes...), soit parce que des acides leurs sont volontairement ajoutés (confiseries, boissons...). Dans ces produits, l'acidité participe à la conservation, mais est également recherchée pour la saveur qu'elle apporte. A l'inverse, dans certains produits (plats cuisinés, panification) l'effet conservateur est recherché sans la saveur acide.

A la différence des acides forts (acide chlorhydrique par exemple) jouant un rôle uniquement sur le pH externe de la cellule, les acides faibles étant lipophiles et capables de traverser la membrane et ainsi d'agir directement sur le pH cytoplasmique. A ce titre, les acides organiques étant pour la plupart des acides faibles agissent plus efficacement pour inhiber les microorganismes.

L'effet acidifiant se manifeste lors de l'ajout d'acide, ceci provoque une diminution du pH externe qui va entraîner une baisse du pH interne des micro-organismes et ainsi inhiber leur développement. Mais, tous les microorganismes n'ont pas la même sensibilité au pH, tout d'abord, le pH interne varie d'un micro-organisme à l'autre (6,5 pour les acidophiles à 9 pour certains alcalophiles). Les bactéries fermentaires par exemple supportent de plus grandes variations de pH interne que d'autres. Enfin, une variation du pH externe d'une unité peut engendrer des variations de 0,1 à 1 unité de pH interne selon le micro-organisme, c'est pourquoi, chaque micro-organisme est caractérisé par un seuil de pH en dessous duquel il ne se développe pas (CHENE, 2002).

Selon METZNER *et al.* (2004), au niveau de la bactérie cible, les premières structures touchées par l'acidification du milieu extracellulaire sont évidemment les macromolécules de surface (flagelle, pili, récepteur chimique, protéines periplasmiques, paroi, etc), les bactéries cibles ont peu de possibilités de protéger ces structures : soit elles modifient la structure des sites de fixation des composés acides au niveau de leurs membranes, soit elles évitent la perte de mobilité suite au stress acide en modulant ou en utilisant une voie métabolique alternative.

DILWORTH *et al.*, (1999) ont souligné que si les bactéries cibles n'arrivent pas à modifier la structure de leurs sites ou proposer une alternative pour éviter la perte de mobilité due au stress acide, les protons vont entrer dans la cellule par le changement de gradient de concentration autour de la paroi bactérienne.

D'après FOSTER (1999), la baisse du pH intracellulaire provoquée par cet afflux de protons entraîne des perturbations de flux métabolique et des dommages au niveau des macromolécules de surface. Cette baisse de pH intérieur va aussi favoriser l'oxydation des lipides modifiant ainsi leur état d'ionisation et de ce fait, leurs propriétés d'interaction avec les autres constituants cellulaires. Le même phénomène a été observé pour les protéines pour lesquelles une diminution du pH va entraîner une augmentation des charges positives, donc une modification de leur état d'ionisation qui va d'un côté, modifier leur configuration spatiale et altérer leur fonctionnalité, et d'un autre, perturber la transcription des gènes. L'ADN lui-même sera affecté par cette baisse de pH qui va altérer les bases puriques et pyrimidiques et ainsi les fragmenter (COTTER *et al.*, 2003).

2.4. Effet des complexes chimique sur les souches microbiennes

Les résultats de l'évaluation de l'effet antimicrobien des complexes chimiques sur les souches testées sont indiqués dans la Figure 16:

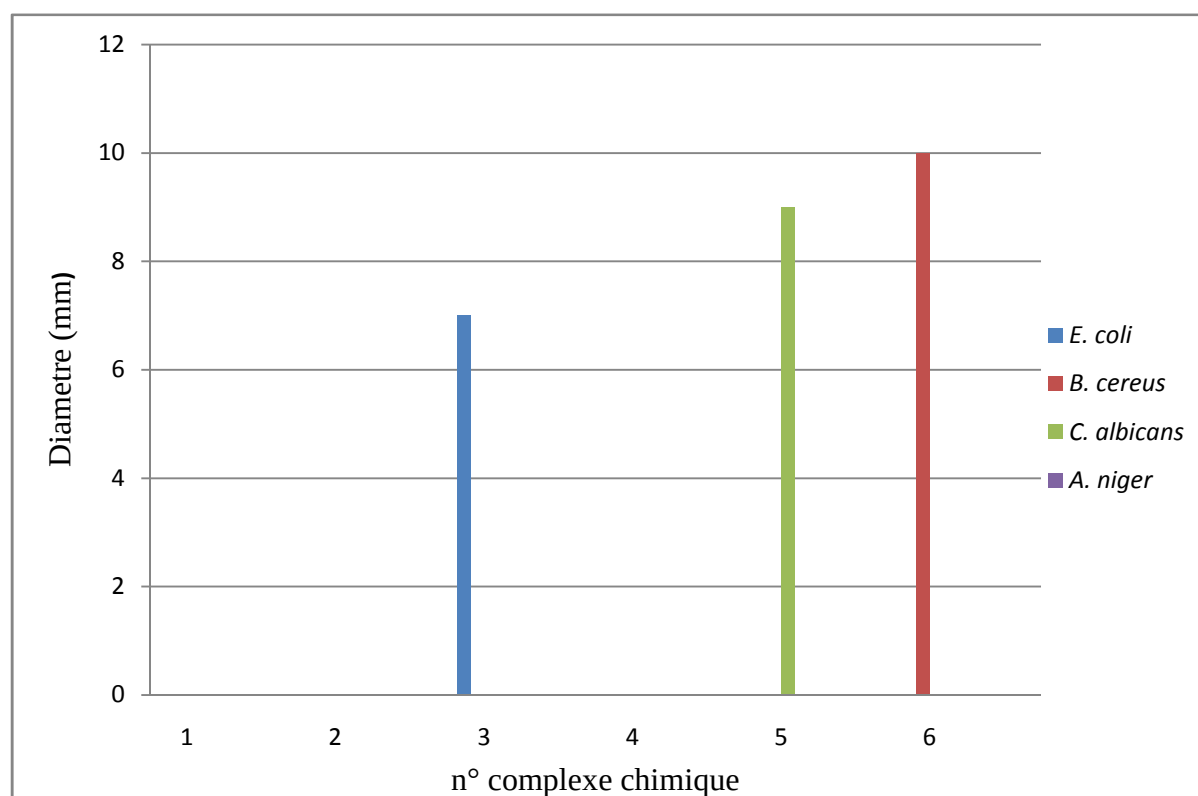


Figure 16: Représentation graphique de l'effet des complexes chimiques sur les Souches microbiennes testées :

Complexe 1 : Cu (H₂dmg) (Arg) (NO₃)₂ H₂O

Complexe 2 : Cu (H₂dmg) (Arg) (Br)₂

Complexe 3 : Cu (Hdmg)₂ (Glu) (NO₃)

Complexe 4 : Cu (Hdmg)₂ (Glu) (SCN) NO₃

Complexe 5 : Cu(Hdmg)₂ (Pro)2(NO₃)2(H₂O)

Complexe 6 : Ni (Hdmg)₂ (Pro) NO₃

Les complexes chimiques ont montré qu'ils sont des agents antibactériens et antifongiques potentiels contre les microorganismes à 10 mg /ml. Ces derniers sont composés d'un ensemble de ligands liés au métal par des liaisons covalentes, la stabilité des complexes est renforcée par des liaisons hydrogène au sein de l'édifice, par ailleurs le cuivre est connu pour être un agent antimicrobien potentiel.

L'activité antibactérienne a été évaluée non seulement sur les complexes seuls, mais aussi sur le DMSO, le ligand primaire (Diméthylglyoxime) qui est constamment présent sur tous les complexes testés, les ligands secondaires (acides aminés) qui varient d'un complexe à un autre, les antibiotiques Aminopeniciline et Cephalosporine (témoins positifs). Les résultats ainsi obtenus sont illustrés dans la Figure 17. Les antibiotiques utilisés présentaient des zones d'inhibition de 14 mm sur *E. coli* et de 25 mm sur *B. cereus*.



Figure 17: Photos illustrant l'effet des antibiotiques témoins sur les deux souches bactériennes: (A) *B. cereus* ; (B) *E. coli*

La diméthylglyoxime ainsi que les acides aminés ont été testés individuellement d'abord, les résultats obtenus montrent qu'ils ne présentent pas d'activité antimicrobienne, de plus aucune zone d'inhibition n'a été observée aussi pour le DMSO, ce qui permet de confirmer qu'il n'est pas impliqué dans l'activité antimicrobienne. Les complexes sont généralement plus efficaces que les ligands utilisés seuls à l'état monocaténaire.



Figure 18 : reprst dsPhotos illustrant l'effet des ligands testées individuellement sur les bacteries: (A) *B. cereus* ; (B) *E. coli*

Selon les résultats obtenus dans la Figures 19, les complexes n° 03 ($\text{Cu}(\text{Hdmg})_2(\text{Glu})(\text{NO}_3)$) et n° 6 ($\text{Ni}(\text{Hdmg})_2(\text{Pro})(\text{NO}_3)$) exercent une activité antibactérienne appréciable, la souche *Escherichia coli* est plus ou moins sensible au complexe n°3, le diamètre de la zone d'inhibition est de 7 mm, par contre *Bacillus cereus* est sensible au complexe n°6 $\text{Ni}(\text{Hdmg})_2(\text{Pro})(\text{NO}_3)$, le diamètre est de 10 mm. L'activité antifongique des complexes a été évaluée, à la lumière des résultats obtenus, nous constatons que seul le complexe n°5 $\text{Cu}(\text{Hdmg})_2(\text{Pro})_2(\text{NO}_3)_2(\text{H}_2\text{O})$ présente une activité contre *C. albicans* dont le diamètre de la zone d'inhibition est de 9 mm. Cet effet pourrait être attribué au cuivre puisque les résultats des ligands testés individuellement n'ont révélé aucune inhibition et que le cuivre est généralement connu pour être un agent antimicrobien potentiel. Tout ceci laisse suggérer que ces complexes ont une activité supérieure à celle des ligands testés à l'état monocaténaire. Cette observation laisse penser que ces complexes pénètrent mieux la membrane de la bactérie avec leur caractère lipophile même si le mode d'action reste toujours en cours de recherche.

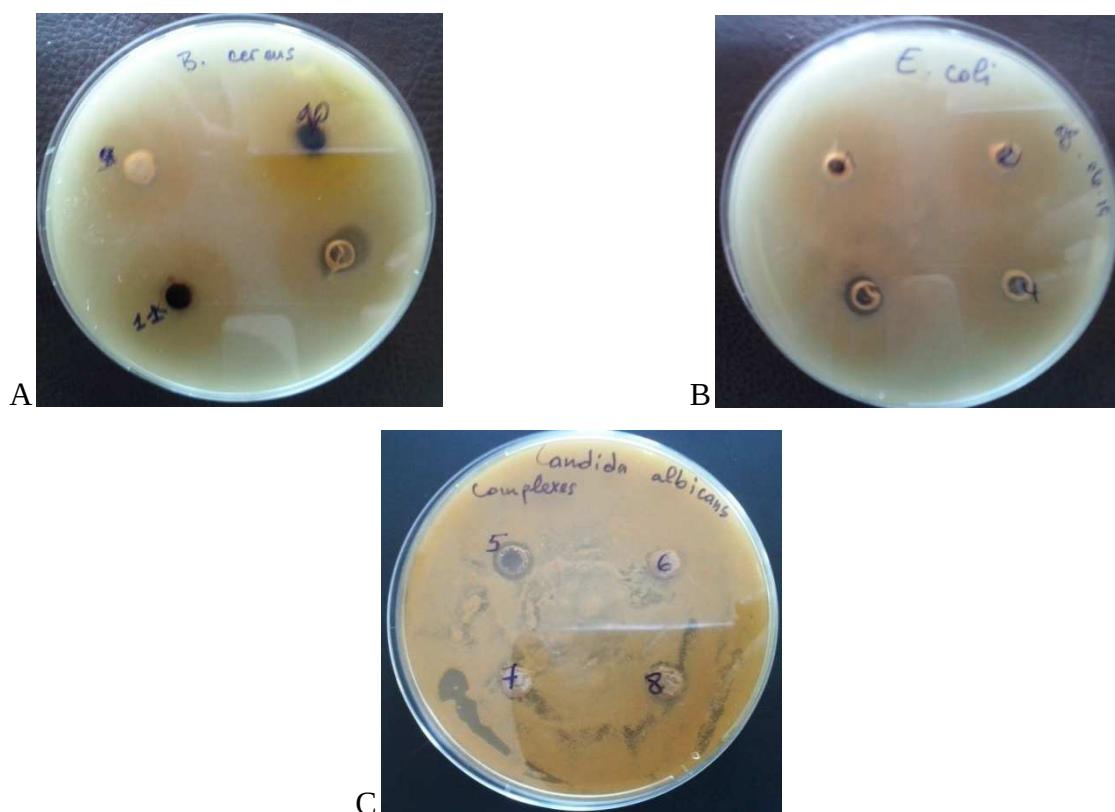


Figure 19: Photos montrant les zones d'inhibition produites par les complexes sur les souches microbiennes (A) *B.cereus* ; (B) *E.coli* ; (C) *C.albicans*

Les autres complexes n'ont produit aucune zone d'inhibition quelle soit la souche microbienne testée, cela est peut être dû à ce que les souches sont simplement résistantes à ces composés donc l'effet est indifférent vis-à-vis des microorganismes ciblés.

Toutefois, il faut mentionner que le mode opératoire de préparation de ces complexes chimiques et leur conservation peuvent influencer sur leurs activités biologiques.

Généralement les complexes à base de métaux de transition et d'acides aminés présentent une activité plus élevée sur les bactéries Gram + que sur les bactéries Gram- (OUSUNJA *et al.*, 2001). Ce qui explique nos résultats obtenus avec une zone d'inhibition plus élevée de 3mm pour *B. cereus* (10 mm) par comparaison à *E. coli* (7 mm).

L'effet inhibiteur des complexes précédemment présumés doter d'un effet antimicrobien pourrait être dû au mécanisme de chélation. Ce mécanisme facilite la capacité du complexe à traverser la membrane cellulaire du microorganisme (SENJUPTA *et al.*, 1998).

La chélation réduit considérablement la polarité de l'ion métallique de cuivre en raison de sa charge positive qui est partiellement partagée entre atomes donneurs présents dans le ligand (TUMER ET EKINCI, 2007).

La chélation est également responsable de l'augmentation du caractère lipophile des complexes et favoriserait leur pénétration à travers la couche lipidique des bactéries, par conséquent nous pouvons dire que la complexation favorise l'activité antibactérienne (TUMMALAPALLI *et al.*, 2015).

Par ailleurs, les propriétés antioxydantes du cuivre jouent un rôle fondamental dans le processus d'activité antimicrobienne; le stress oxydatif provoque des dommages sur les molécules d'ADN, les lipides et les protéines (ALAGESAN, 2013). La forte interaction entre le cuivre sous forme de complexe avec l'ADN provoquant un clivage de la molécule par mécanisme d'hydrolyse ou d'oxydation (CHEN *et al.*, 2011).

Le moment dipolaire dans une molécule, qui résulte de la répartition des charge des atomes, est un paramètre important dans l'activité antibactérienne, plus le moment est élevé plus l'activité antibactérienne diminue (TIDJANI, 2014).

2.5. Effet du chitosane sur les différentes souches microbiennes

Les résultats de l'évaluation de l'effet antimicrobien du chitosane sur les souches testées sont indiqués dans la Figure 20.

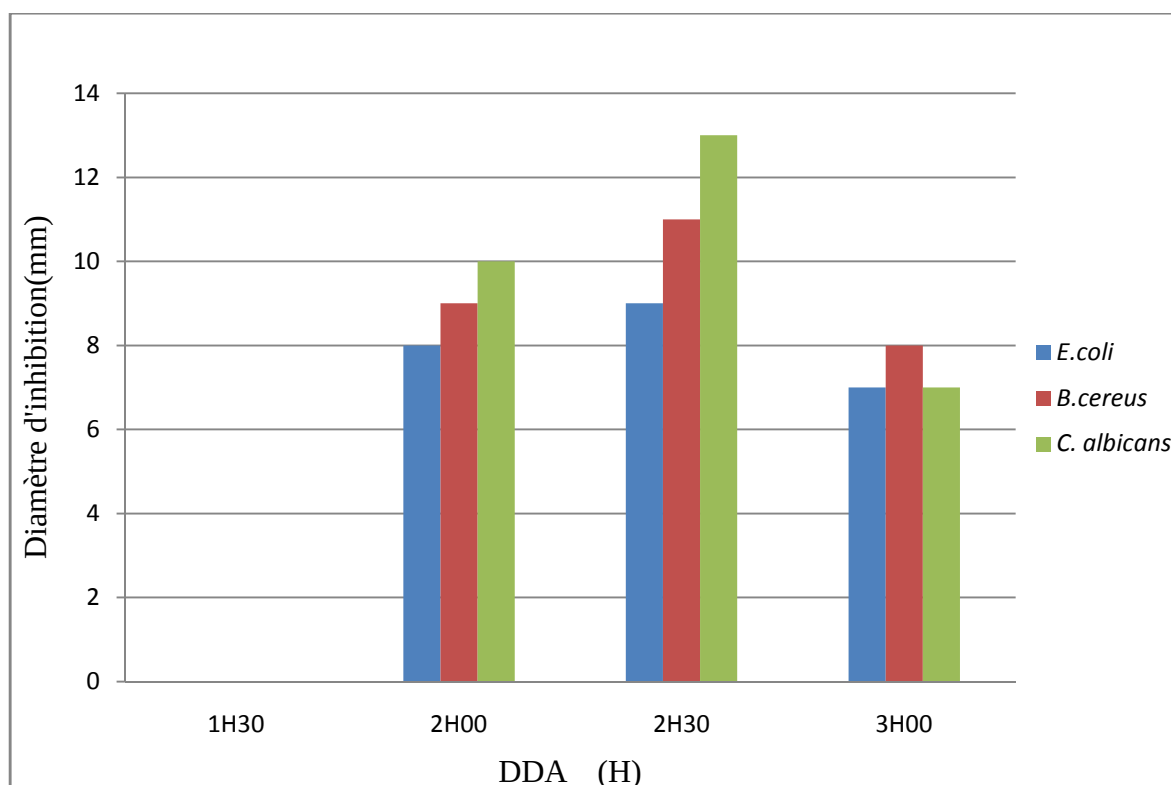


Figure 20 : représentation graphique de l'effet du chitosane a différents DDA sur les souches microbiennes testées

Plusieurs études ont été menées sur l'effet antimicrobien du chitosane présents dans des produits carnés. Par exemple, des tests préalables sur des bouillons de viande ont démontré des inactivations complètes d'*E. coli* (WANG, 1992).

L'effet antimicrobien du chitosane désacétylé pendant 01H30 semble n'avoir aucun effet sur les souches testées car aucune zone d'inhibition n'a été visible. Donc, nous pouvons t déduire que ce degré de désacétylation du chitosane est largement insuffisant pour provoquer une quelconque zone d'inhibition.

Pour le chitosane désacétylé pendant 02H00 un effet antimicrobien a été aperçu, les diamètres étant compris entre 8 et 10 mm; ce qui explique que le DDA a atteint un seuil suffisant pour provoquer une activité antibactérienne et antifongique.

Le chitosane désacétylé pendant 02H30 donne un effet meilleur, la zone d'inhibition est plus élevée, le diamètre maximal de 13 mm étant obtenu avec *C. albicans*, suivi des valeurs de 11 mm pour *B cereus* et de 9 mm pour *E coli* qui semblent ainsi être relativement moins sensibles. Par contre, *A. niger* s'est montré relativement résistant en ne manifestant aucune zone d'inhibition mais un retardement de la croissance. Donc, plus le DDA augmente plus l'activité antimicrobienne est importante.

Cependant, le chitosane désacétylé pendant 03H00 devrait avoir un effet inhibiteur plus puissant que les précédents, il semble donner des résultats contradictoires avec une baisse des diamètres d'inhibition, cela pourrait être dû à une mauvaise manipulation lors de la préparation de la solution.

Néanmoins, il faut noter que *A. niger* est la souche microbienne la plus résistante envers le chitosane, quel que soit le degré de désacétylation, sachant qu'il n'y a aucune zone d'inhibition même après 72H d'incubation, si ce n'est un retardement de la croissance. Un retardement de la sporulation pourrait expliquer que le chitosane favoriserait la croissance fongique par un apport de substances nutritives qui prolongerait le temps de sporulation.

L'action antimicrobienne apparaît comme fortement dépendante des caractéristiques du chitosane utilisé (origine, degré de polymérisation, pourcentage de résidus N acétylés) et des facteurs environnementaux tels que la teneur en eau de la matrice alimentaire et surtout son pH (BORDERIAS *et al.*, 2005).

Selon la littérature scientifique, l'activité antimicrobienne du chitosane peut être affectée par les facteurs physiques et biologiques qui comprennent la concentration chimique, le poids moléculaire, le degré de désacétylation, le pH et la température. Le chitosane et ses dérivés ont été testés dans des conditions très variées, il est difficile de comparer l'effet

antibactérien de chitosane parmi les résultats obtenus par différentes études (NO *et al.*, 2002; ZHENG *et al.*, 2003).

La principale caractéristique du chitosane est probablement sa charge positive au niveau des groupements amine (NH_3^+) à l'extrémité du carbone numéro 2 positionné dans le monomère de glucose, lorsque le pH est inférieur à son pKa (6,3). Ceci forme une structure polycationique qui peut interagir avec les composés anioniques et les structures macromoléculaires de bactéries (HELANDER *et al.*, 2001; JEON ET KIM., 2001).

Des chercheurs ont affirmé que la charge positive des groupements du chitosane peut modifier la surface bactérienne en augmentant la perméabilité membranaire, causant la fuite de substances intracellulaires (par exemple, des protéines, y compris lactate déshydrogénase, d'acides nucléiques et le glucose), ou une diminution de la perméabilité de la membrane. En outre, il a été suggéré qu'il y'a formation d'une couche imperméable autour de la cellule bactérienne, cette dernière bloquant ainsi le transport de solutés essentiels dans la cellule induisant la mort cellulaire (CHEN *et al.*, 2003).

La mort cellulaire est due à une perte de l'intégrité des membranes et parois cellulaires, en même temps qu'une interférence avec les voies métaboliques génératrices d'énergie liées à la membrane cellulaire (ZUEHLKE *et al.*, 2013).

Il a également été postulé que le chitosane chargé positivement se lie avec l'ADN, inhibant ainsi la transcription de ce dernier. Les nanoparticules du chitosane sont ultrafines et solubles dans l'eau et peuvent pénétrer la paroi cellulaire de bactéries et de les combiner avec de l'ADN et inhiber la synthèse de l'ARNm et la transcription d'ADN (TSAI ET SU, 1999).

Les concentrations antimicrobiennes décrites dans la littérature sont très variables du fait des variations du chitosane utilisés et de l'environnement physico-chimique. Il a été constaté que le maximum d'activité bactéricide est observé à des concentrations suffisantes de chitosane fortement désacétylé (degré de désacétylation > 70), l'effet observé est clairement bactéricide (SHAHIDI *et al.*, 1999).

Dans un premier temps, des tests réalisés *in vitro* par JE ET KIM (2006) sur *E. coli*, *Pseudomonas spp* (Gram-), et *Listeria innocua* et *Brochothrix thermosphacta* (Gram+) ont montré qu'à partir de la concentration de chitosane de l'ordre de 0,2 %, une inactivation totale ou partielle (entre 1 et 3 log CFU/mL) des souches testées est observée. Des essais sur des flores pathogènes (*Listeria monocytogenes* et *Salmonella*) présentes dans des marinades de viandes bovines inoculées artificiellement avec des flores pathogènes et d'altération sont envisagés.

3. Détermination de la CMI des différents agents antimicrobiens

Après une incubation, la détermination de la CMI est basée sur l'observation de la présence ou non d'une croissance microbienne. L'absence d'une croissance indique une inhibition du développement microbien. Etant donné que la CMI est la plus petite concentration du produit testé qui ne présente pas une croissance microbienne.

Les CMI déterminées pour toutes les souches microbiennes testées sont rapportées dans le Tableau 15.

Tableau 15 : Valeurs des CMI des différentes souches microbiennes testées :

		<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>A. niger</i>	<i>C. albicans</i>
HE		0,66%	0,33%	0,33%	0,33%
Acide citrique		25%	3,33%	-	23,33%
Chitosane		-	33,33%	-	66,66%
Complexes chimiques	C 03	50%	-	-	
	C 05	-	-	-	26,66%
	C 06	-	33,33%	-	

Les CMI ont été calculées uniquement pour des agents ayant un effet inhibiteur lors des tests précédents (puits de diffusion), plus la valeur de la CMI baisse plus l'activité antimicrobienne de l'agent testé est meilleure.

Les résultats de la détermination des CMI montrent une variabilité dans la sensibilité des souches aux différents agents antimicrobiens. Les valeurs des CMI varient de 0.33 à 50% pour les souches bactériennes (*E. coli*, *B.cereus*) et de 0.33% à 66.66% pour les souches fongiques (*A. niger* *C. albicans*) .

La meilleure CMI (CMI = 0,33%) a été obtenue avec l'huile essentielle de *T. vulgaris* testée sur les souches *B. cereus*, *C. albicans* et *A. niger* avec une (Figure 21). Une CMI de 0.66% a été observé pour *E. coli*, qui correspond au double des valeurs obtenues pour les trois autres souches. Ces résultats montrent que l'huile de thym a un effet inhibiteur très puissant envers toutes les souches testées, avec des CMI plus importantes à celle des autres agents antimicrobiens testés.



Figure 21 : Résultat du test des spots de la CMI de l'HE de Thym sur *B.cereus*

Si nous comparons les CMI obtenues avec l'acide citrique sur *E. coli* (25%) versus *B. cereus* (3.33%), nous pouvons conclure que la deuxième souche est largement plus sensible à l'effet de l'acidité.

La CMI obtenue avec *C. albicans* est de l'ordre 26,66%, au delà de cette valeur, nous pouvons déduire que *C. albicans* est plus sensible à l'effet de l'acidité que *A. niger*.

Les CMI obtenues avec le chitosane (Figure 22) testé sur les deux souches bactériennes est la même 33.33%, tandis que pour *C. albicans*, la valeur de la CMI est double, soit 66.66%.



Figure 22 : Résultat du test des spots de la CMI du chitosane désacétylé (02H30) sur *E. coli*

La CMI correspondant au complexe n°3 « $(\text{Cu}(\text{Hdmg})_2(\text{Glu})(\text{NO}_3))$ » testé sur la souche *E. coli* a été obtenue avec une concentration de 50% .

La CMI attribuée au complexe n°5 « $\text{Cu}(\text{Hdmg})_2(\text{Pro})_2(\text{NO}_3)_2(\text{H}_2\text{O})$ » testé sur la souche *B. cereus* a été obtenue avec une concentration de 26.66% .

La CMI correspondant à le complexe n°6 « Ni(Hdmg)₂ (Pro)NO₃ » testé sur la souche *C. albicans* a été obtenue avec une concentration de 33,33% .

A partir de ces résultats on peut déduire que les meilleures CMI ont été obtenues avec les souches bactériennes et la levure *C. albicans* révélée la plus résistante.

4. Détermination de la CMB et CMF des différents agents antimicrobiens

Les valeurs de la CMB et CMF rapportées dans le Tableau 16 sont déterminées à partir des résultats de repiquage des souches prélevées à partir des boîtes qui n'ont pas présenté un développement lors de l'observation des résultats des CMI.

Tableau 16 : Résultats de la CMB des différentes souches microbiennes

Les agents antimicrobiens		<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>A. niger</i>	<i>C. albicans</i>
HE		1%	0,33%	0,66%	0,66%
Acide citrique		13,33	8,33%	-	33,33%
Chitosane		33,33%	33, 33%	-	66,66%
Complexes chimiques	C 03	50%	-	-	-
	C 05	-	-	-	33,33%
	C 06	-	40%	-	-

La meilleure CMB a été obtenue à partir de l'huile de *T. vulgaris* (0,33%) testé sur *B. cereus* qui est égale à la CMI (0,33%).

La CMB de chitosane désacétylé pendant 2H30 est égale à la CMI (33,33%) obtenue sur *E. coli* et *B.cereus* et une CMF de 66,66% qui est obtenue avec la levure *C.albicans* qui est égale aussi à la CMI de cette levure (Figure 24).

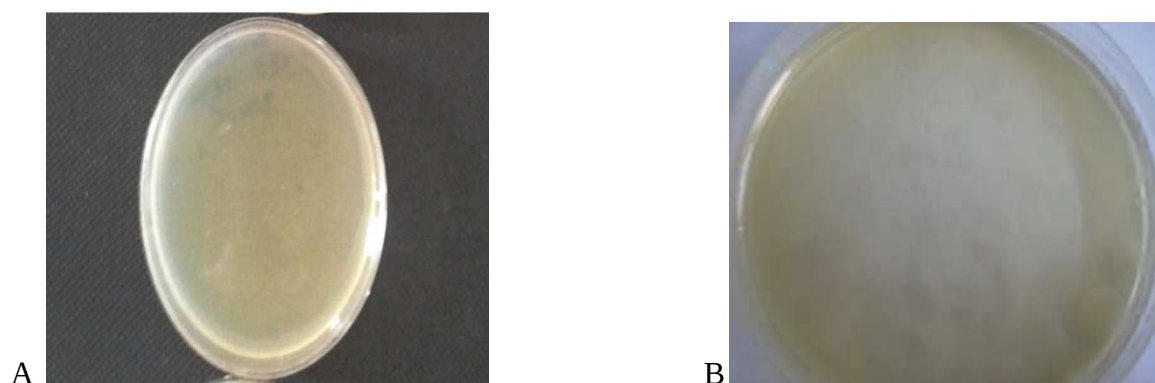


Figure 23 : Photo montre la CMB de chitosane désacétylé sur les souches testées: (A) *B. cereus* ; (B) *C. albicans*

La CMB du deux complexe n° 03 et no 06 testés sur les deux bactéries *E.coli* ; *B.cereus* est aussi égale à la CMI, 50 et 40% respectivement (Figure 5)

Donc, nous pouvons dire que le chitosane ainsi que les complexes n°03 et no 06 ont un effet bactéricide à la même concentration inhibitrice (CMI) obtenues avec les souches microbiennes.

La CMB de l'acide citrique testé sur les souches bactériennes (*E. coli* et *B. cereus*) est égale au double de la CMI (13,33 et 8,33%), donc pour inhiber ces souches il faut utiliser une concentration plus élevée de l'acide citrique.

Concernant les souches fongiques (*C. albicans* et *A. niger*), la CMF de l'huile essentielle *T. vulgaris* (0.66%) est égale au double de la CMI. Donc pour inhiber ces souches, nous avons besoin des concentrations d'huile essentielle de *T. vulgaris* plus élevées, alors que pour les autres agents antimicrobiens (acide citrique, Chitosane et le complexes chimiques) la CMF de la levure *C. albicans* est presque égale à la CMI.

La comparaison de la CMI versus CMF chez *C. albicans* se résume comme suit:

- Acide citrique (23,33% $\approx$ 33,33%)
- Chitosane (66,66 % = 66,66%)
- Complexe chimique (26,66% $\approx$ 33,33%),

Les notions de CMI et de CMF ne sont pas définies de façon précise et universelle, les auteurs peuvent exprimer les résultats dans différentes unités (en mg/ml, en μ l/ml, en %(v/v), etc.) Ce qui rend difficile la comparaison des résultats entre eux.

La composition exacte des huiles étudiées n'est pas toujours précisée dans les articles et nous pouvons supposer que la différence d'activité biologique est due à la différence de la composition chimique des huiles essentielles (DEGRYSE *et al.*, 2008).

Les huiles essentielles peuvent fournir une source de fongicides utiles qui peuvent être utilisées contre *l'Aspergillus fumigatus* et *l'Aspergillus niger* (BANSOD *et al.*, 2008).

Un effet sporicide a été observé lors de la mise en contact des souches fongiques, juste après la phase de sporulation, avec l'huile essentielle de *Thymus vulgaris*. Les spores formées n'étaient pas viables. L'efficacité des huiles essentielles qui agissent sur la phase de sporulation est liée à une période de vulnérabilité plus grande des cellules (formation de nouveaux organes) ce qui pourrait faciliter la pénétration des huiles dans les cellules (DEGRYSE *et al.*, 2008).

Plusieurs facteurs rendent difficile la comparaison de nos résultats à ceux décrits par d'autres auteurs comme: la nature de l'huile testée et sa composition chimique, ainsi que les autres facteurs : le protocole ou la méthode de leur préparation, la souche bactérienne ou

fongique ciblée et son stade du développement, la méthode utilisée, les conditions de manipulation, l'expression des résultats, etc.

5. Effet de la combinaison des agents antimicrobiens

Afin de déterminer une éventuelle interaction entre les agents antimicrobiens testés précédemment, nous avons testé l'effet de leurs mélanges. Selon FLAUIRO (2011), lors de la combinaison de substances antimicrobiennes, trois effets sont à distinguer : addition, antagonisme ou synergie. Pour des objectifs de quantification, le concept des concentrations inhibitrices fractionnelles (CIF) est fréquemment utilisé.

5. 1. Effet de la combinaison acide citrique et complexe chimique

Les résultats des tests de combinaison acide citrique et complexe chimique sont regroupés dans les Tableaux 17 et 18.

Tableau 17: Diamètre des zones d'inhibition (mm) produites par le mélange acide citrique à différentes concentrations avec le complexe n°03 sur *E. coli* :

Acide citrique (%)	10%	08%	06%	04%	03%
Complexe chimique n° 03	10	9	7	0	0

Tableau 18: Diamètre des zones d'inhibition (mm) produites par le mélange acide citrique à différentes concentrations avec le complexe n°06 sur *B. cereus*.

Acide citrique (%)	10%	08%	06%	04%	03%
Complexe chimique n° 06	15	12	10	7	0

L'effet combiné de l'acide citrique à différentes concentrations avec le complexe no3 testé sur *E. coli* a permis d'obtenir des zones d'inhibition comprises entre 10 et 7mm pour des concentrations supérieures à 6% d'acide citrique. Pour les concentrations inférieures à 6%, aucune zone d'inhibition n'a été constatée. Ainsi, nous pouvons déduire que l'effet du complexe est négligeable à celui de l'acide citrique puisque durant tout le test la concentration du complexe était constante (10mg/ml), seule la concentration de l'acide citrique était en

variation (Figure 24). Puisqu'aucune zone d'inhibition n'est apparue à la plus faible concentration d'acide citrique, ceci montre que le composé a un effet négligeable.

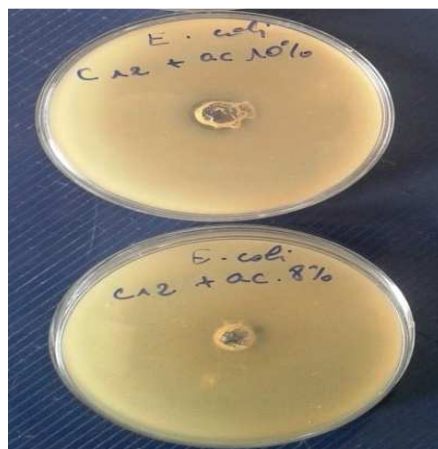


Figure 24: Photo illustrant l'effet de la combinaison complexe no 6 acide citrique sur *E. coli*

Pour ce qui concerne l'association du complexe no 6 combiné à l'acide citrique testé sur *B. cereus*, les résultats sont en accord avec ceux observés avec l'association complexe n°3 et acide citrique (Figure 25), mais avec des zones d'inhibition plus importantes que celle obtenue avec *E. coli*.



Figure 25 : Photo illustrant l'effet de la combinaison Complexe n°3 et l'acide citrique sur *B. cereus*

5.2-Effet combiné de l'huile de thym et l'acide citrique

Le Tableau 19 regroupe les résultats de l'effet de la combinaison de l'HE de thym et de l'acide citrique sur *B. cereus*.

Tableau 19 : Résultats des interactions entre l'huile de thym et l'acide citrique sur *B. cereus*.

HE% \ AC%	100%	50%	25%	12.5%	6.25%
	Ø=30	Ø=28	Ø=26	Ø=20	Ø=15
10% Ø=16	60	60	60	28	18
8 % Ø=13	60	60	26	20	16
6% Ø=12	60	60	25	20	15
4% Ø=07	60	60	20	17	13
3% Ø=00	23	22	17	15	10

Les résultats du Tableau 19 montrent que la combinaison des deux agents antimicrobiens : HE de *T. vulgaris* et acide citrique, exerce différents effets inhibiteurs sur la croissance de *B. cereus*.

La bactérie a montré une grande sensibilité (Ø compris entre 10 et 60mm) à la combinaison entre l'HE et l'acide citrique avec des diamètres de 60mm qui correspondent à une inhibition totale de la croissance bactérienne, et les diamètres baissent progressivement lorsque les concentrations d'acide et de l'huile baissent (Figure 26).

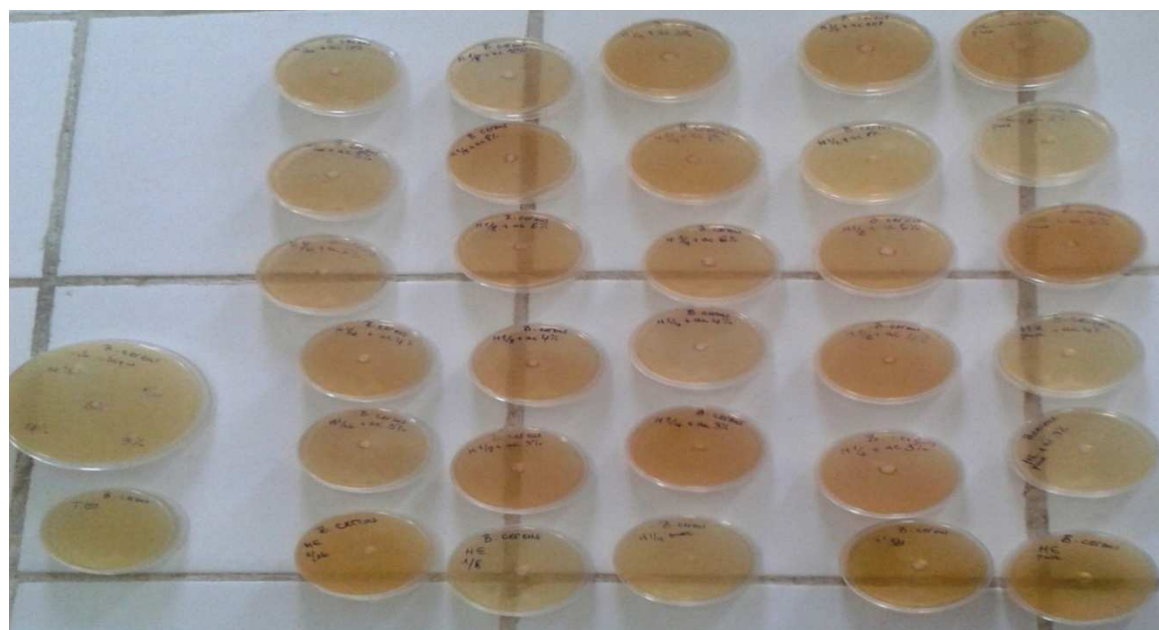


Figure 26 : Photos illustrant l'effet combiné de l'acide citrique et l'HE *T. vulgaris* sur *B. cereus*.

Nous pouvons affirmer que l'HE de *T. vulgaris* exerce un effet inhibiteur très puissant quand elle est associée à l'acide citrique. Même avec la diminution de la concentration de l'acide citrique, l'effet inhibiteur reste encore important.

Néanmoins, les zones d'inhibition restent constamment supérieures à la valeur de 10mm, ce qui confirme la grande sensibilité de *B. cereus* à l'effet combiné de ces deux agents.

5.3- Effets de l'huile de thym et de l'acide citrique sur *E. Coli*

Les résultats de l'effet de la combinaison du thym et de l'acide citrique sur *E. coli* sont regroupés dans le Tableau 20.

Tableau 20 : Résultats des interactions entre deux agents antimicrobiens (l'huile de thym et l'acide citrique) sur *E. coli*.

HE % \ AC %	100%	50%	25%	12.5%	6.25%
100%	Ø=25	Ø=20	Ø=18	Ø=18	Ø=15
10%	Ø=14	30	25	25	21
8 %	Ø=11	25	23	24	20
6%	Ø=10	23	18	24	22
AC 4%	Ø=07	20	18	23	20
AC 3%	Ø=00	17	15	20	16

Les résultats du Tableau 20 montrent que la combinaison entre l'HE de *T. vulgaris* et l'acide citrique exerce des effets inhibiteurs variable sur la croissance de *E. coli*.

Les diamètres d'inhibition obtenus pour *E. coli* sont compris entre 30 mm (Figure 28) pour la valeur maximale (HE100% avec AC10%), cette valeur a été obtenue pour l'association des deux concentrations les plus élevées ainsi que la valeur minimale de 10mm a été obtenue avec les concentrations les plus faibles (HE 6.25% avec AC 3%).

Les résultats du Tableau 21 indiquent un décroissement progressive des diamètres des zones d'inhibition, plus l'huile et l'acide sont dilués plus les zones d'inhibition se rétrécissent, il faut aussi signaler qu'aucune inhibition totale de la croissance n'a été observée pour cette bactérie.

A faible concentration, l'acide citrique semble avoir un effet très faible lorsqu'il est testé individuellement, mais associé à l'huile, les résultats sont différents et la zones d'inhibition sont considérablement plus larges, ce qui explique que l'huile exerce l'effet inhibiteur le plus important et que l'acide exerce un effet additionnel qui améliore l'activité antimicrobienne.

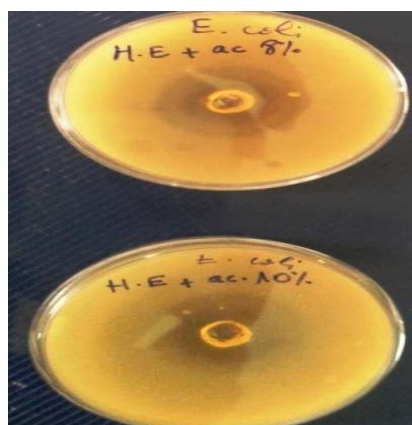


Figure 27 : Photo illustrant l'effet de la combinaison HE et acide citrique sur *E. coli*.

5.4- Effets de l'huile de thym et de l'acide citrique sur *Candida albicans*

Le Tableau 21 regroupe les résultats de l'effet de la combinaison du thym et de l'acide citrique testée sur *C. albicans*.

Tableau 21 : Résultats des interactions entre l'huile de thym et l'acide citrique sur *C. albicans*.

HE % A.C %	100% Ø=60	50% Ø=30	25% Ø=25	12.5% Ø=20	6.25% Ø=13,5
10% Ø=08	60	60	38	35	30
8 % Ø=07	60	60	30	29	26
6% Ø=06	60	60	36	26	24
4% Ø=00	30	32	30	23	21
3% Ø=00	28	26	25	20	13,5

Les résultats du Tableau 21 montrent que la combinaison des deux agents antimicrobien : HE de *T. vulgaris* et acide citrique, exerce différents effets inhibiteurs sur la croissance de *C. albicans*.

Les résultats montrent des zones d'inhibition totale à de fortes concentrations comprises entre 100 à 50% d'HE et de 10 à 6% d'acide citrique. Au delà de ces valeurs, les zones d'inhibition ne sont plus totales et ils sont décroissantes progressivement en fonction de la baisse des concentrations d'acide citrique et de l'huile essentielle de thym. Cependant les diamètres d'inhibition restent constamment supérieurs à 13mm pour toutes les concentrations testées, ce qui affirme que l'effet combiné de l'huile et de l'acide est très performant sur *C. albicans*. L'effet de ces deux agents sur la croissance de *C. albicans* est plus important que l'effet de l'acide citrique et HE utilisé seuls.

Les zones d'inhibition obtenues avec *C. albicans* sont largement supérieures à celles observées précédemment sur *E. coli* et *B. cereus*, ce qui explique que cette levure est plus sensible à la combinaison huile essentielle et acide citrique.

Par ailleurs, des zones d'inhibitions de 60 mm (inhibition totale) ont été aussi observées pour les plus hautes concentrations d'acide citrique et de huile essentielle (cas de *B. cereus*), ces valeurs diminuent aussi progressivement jusqu'à atteindre la valeur minimale de 13.25mm qui reste une valeur importante.

Les résultats obtenus permettent de relever une interaction positive entre l'huile de thym et l'acide citrique à des concentrations différentes, l'huile de thym a exercé un effet additionnel ou a renforcé l'effet de l'acide citrique.

D'une façon générale, la comparaison entre les diamètres des zones d'inhibition des agents antimicrobiens testés individuellement et testés de façon combinée permet de déduire la nature de l'interaction et de déduire aussi l'agent ayant l'effet combiné intense. Selon nos résultats, un effet additionnel s'est produit et l'huile de thym est responsable de la plus grande partie de l'activité antimicrobienne et elle a une interaction positive avec l'acide.

Selon les travaux déjà rapportés, l'acide citrique à une concentration inférieure à 10% est un agent antibactérien très faible, mais en présence du cavaracrol il agit comme précurseur augmentant la perméabilité de la membrane bactérienne, ce qui facilite le transport du cavaracrol dans la cellule (ULTEE *et al.*, 2000 ; KISKO *et al.*, 2005). D'après LAMBERT ET SES COLLABORATEURS (2001), les composants majoritaires de structures semblables comme le cavaracrol et le thymol, une fois combinés, donnent suite à une action additive.

Selon RASOOLI (2007), en règle générale, la sensibilité des bactéries à l'effet inhibiteur des HE's semble augmenter avec une diminution du pH de l'aliment, la température

de stockage et la quantité d'oxygène dans l'emballage. A pH faible, l'hydrophobicité de l'HE augmente ce qui lui permet de se dissoudre plus facilement dans les lipides de la membrane cellulaire des bactéries cibles.

L'efficacité de la combinaison des HEs et des acides organiques pourrait apparaître comme une alternative intéressante pour l'industrie alimentaire lorsque les doses inhibitrices sont réduites.

Selon MICHIEL *et al.* (2007), les isomères phénols thymol et carvacrol ont montré les mêmes propriétés antimicrobiennes. A pH bas, ces molécules sont sous forme indissociée et hydrophobe qui peut conduire à une meilleure association avec les domaines hydrophobes des protéines, donc il y a une bonne accumulation dans la phase lipidique de la membrane des cellules qui est le siège de beaucoup d'interactions métaboliques.

De récentes études ont permis de déduire la concentration minimale inhibitrice de composés naturels acides à pH 5, 6 et 7, tels que les acides (r-hydroxybenzoïque, l'acide férulique, o-coumarique et l'acide syringique) qui ont été sélectionnés et testés en combinaison avec les l'huiles essentielles les plus actifs. Les niveaux de pH inférieurs ou bas ont considérablement amélioré l'activité antimicrobienne. La plupart des combinaisons d'huiles essentielles et d'acides phénoliques ont montré des effets synergiques à pH 5, alors que seul l'acide férulique, plus l'isothiocyanate d'allyle ont montré une synergie pH 6. L'utilisation combinée de ces composés naturels peut améliorer leur effet antimicrobien et peut éliminer des microorganismes pathogènes tels que *L. monocytogenes* dans les produits alimentaires légèrement ACIDES (MIYAGUE *et al.*, 2015).

De récentes études ont permis de déduire que les huiles de thymus, de romarin et d'origan, dans un mélange avec une dose sub-létale de l'acide lactique réduisent considérablement la population de *L. monocytogenes* dans les produits alimentaires (DIMITRIJEVI *et al.*, 2007).

Les huiles essentielles, en combinaison avec un agent de conservation sûr, comme l'acide lactique, sont appelés à devenir des additifs alimentaires prometteurs. L'acide lactique est largement utilisé pour le traitement des aliments et comme agent de conservation de la nourriture et de décontamination, ce qui a conduit à sa généralisation (GONCALVES *et al.*, 2005).

Conclusion

Conclusion générale

Le but de nôtre étude d'évaluer l'activité anti microbienne des agents antimicrobiens de différentes origines, ainsi que de réaliser quelques une de leurs associations.

Les résultats du test *in vitro* nous ont montré la grande sensibilité des souches testées à l'huile essentielle de thym. Même testées à des dilutions élevées, elle reste de loin le meilleur agent parmi les autres utilisés.

Les résultats de l'acide citrique testé individuellement ont révélé que les deux souches bactériennes ainsi que la levure *C. albicans* sont sensibles à l'effet de l'acide citrique, mais la sensibilité est variable selon concentration utilisée.

L'acide citrique est déjà connu pour d'être utilisé dans la conservation de produits alimentaires, mais une éventuelle association avec d'autres agents reste une alternative très prometteuse dans l'industrie agroalimentaire afin de prolonger la durée de conservation des aliments.

La combinaison acide citrique -huile essentielle de thym a montré un effet additionnel intéressant, ceci laisse penser qu'elle peut diminuer les effets secondaires liés à l'utilisation des huiles essentielles (toxicité et modifications organoleptiques). De même le pH peut influencer l'effet d'une huile essentielle tel que le cas de la combinaison acide citrique -huile essentielle de thym qui a montré un effet bactéricide sur *B. cereus*, et fongicide sur *C. albicans*, alors que les deux substances testées séparément ont montré un effet inhibiteur partiel.

L'activité antimicrobienne de chitosane semble être moins efficace que celle de l'huile essentielle de thym et celle de l'acide citrique. Cependant, les résultats obtenus restent prometteurs pour l'avenir, il serait intéressant de trouver un moyen d'augmenter son potentiel antimicrobien par d'éventuelles associations avec d'autres agents conservateurs tels que les additifs alimentaire. Cependant, ce dernier s'est montré inefficace vis avis d'*A. niger*. Alors que les souches bactériennes *E. coli* et *B. cereus* ainsi que *C. albicans* on été sensibles.

Il est cependant clair que les propriétés de ce biopolymère sont fortement liées à son environnement physico-chimique et à ses caractéristiques intrinsèques telles que son degré de polymérisation.

Parmi les complexes étudiés, seulement trois d'entre eux on montré une activité antibactérienne et antifongique. Les résultats obtenus *in vitro* ont révélé un potentiel antimicrobien plus ou moins faible pour ces composés. Nous avons constaté que les

Conclusion générale

complexes les plus actifs sont respectivement le complexe n°3 contre *E. coli* et le n°5 contre *C. albicans* et le n°6 contre *B. cereus*

Même si leur utilisation dans le domaine agroalimentaire est loin d'être évidente actuellement, une éventuelle utilisation comme molécules additionnelles incorporées dans les détergents peut être envisagée afin d'augmenter leur potentiel ou bien dans l'élaboration des futures molécules antimicrobiennes de demain.

Toutefois, d'autres études sont à suggérer en guise de perspectives, entre autres essais d'application dans des matrices alimentaires, l'évaluation des interactions négatives éventuelles de ces agents avec les protéines des aliments ou les enzymes digestives, ainsi que la flore intestinale.

A

ABDEL RAHMAN L, BATTAGLIA P. (1996). "Synthesis, characterization and stability constant determination of l-phenylalanine ternary. *Polyhedron*, 15, 327-334.

ADEBAYO C.O AND ADERIYE B.L. (2010). Antifungal activity of bacteriocins of lactic acid bacteria from some Nigerian fermented foods. *Research Journal of Microbiology*, 5, 1070-1082.

ADKHIS A, DJEBBAR-SID S, BENALI-BAIATICH O, KADRI A, KHAN MA, BOUET G. (2003). Synthesis, characterization and electrochemical behaviour of mixed-ligand complexes of cobalt(III) with dimethylglyoxime and some amino acids. *Synth. React. Inorg. Met. –Org. Chem*, 33(1), 35-50.

AFNOR (Association Française de Normalisation). (1998). Recueil de norme Française. Huile essentielle. AFNOR.

AGGAG M.E., FAWZI M.A., FANAKI N.H, OMAR H.G AND GOUDADR. (2006). Some Factors Affecting the Antimicrobial Activity of Chitosan, *N.Egypt. Journal of Microbiology*, 56, 225-232.

ALAN L, MILLER N.D. (1996). antipxydant flavonoides, function and clinical usage. *Alternative Medecine, Review*, 1, (2), 4-10.

ALAGESAN M, BHUVANESH N.S.P., DHARMARAJ N. (2013). Potentially cytotoxic new copper(II) hydrazone complexes, synthesis, crystal structure and biological properties , *Dalton Trans*, 42, 7210.

ANGEL A, RECIO D, FERNANDA B, DA C, OSCAR E, CASTELLANO E, SONIA R.W., HELOISA B. (2012). *Polyhedron, journal of Inorganic and Nuclear Chemistry*, 38, 285–290.

B

BARVE V, AHMED F, ADSULE S, BANERJEE S, KULKARNI S, KATIYAR P, ANSON C.E., POWELL A.K., PADHYE S, SARKAR F.H. (2006). Flavonoids and their properties to form chelate complexes, *j Med. Chem*, 49, 3800.

Références bibliographiques

- BEKHECHI C. ATTK- BEKKARA F. ABDELOUHIB D.E. (2008).** Composition et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *origanum glandulosum d'Algerie-phytotherapie*, 6, 153-159.
- BENIDICTE F, HOOPER D.C. (1998).** Effect of mutation in GRIA of topoisomerase IV, from *staphulococcus aureus* on quinplene . ang, 42(8), 2109- 2112.
- BENKIKI N. (2006).** Etude phytochimiques des plantes médicinales Algérienne : *Ruta montana*, *Matricaria pubescences* et *Hypericum perforiatum* Thèse de Doctorat .Université de BATNA.
- BERGHE et VLIETINCK . A. (1991).** Screening Methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. *Method for Plant Biochemistry*. P: 512.
- DE BILLERBECK V.G. (2007).** Essenssial oil and bacteria resistant to lantibiotic, *Phytotherapie*, 5, 249-253.
- BILGRAMI K.S., SINHA K.K., SINHA A.K. (1992).** Inhibition of aflatoxin production and growth of *Aspergillus flavus* by eugenol, onion, and garlic extracts. *Indian. Journal of Medical Research*, 96, 171-175.
- BIRSEN , BUYUKTAS, OZGUR. (2006).** Atlas. *transition metal chimistery*, 31, 56-61.
- BORDERIAS A.J., SANCHEZ A.I., PEREZ-MATEOS M. (2005).** New applications of fibers in foods : Addition to fishery products. *Trends Food Sci. Technol*, 16, 458–465.
- BOUHDID S, DAOMARL M. ZHIRI A, BOUHDID D, SKALI N.S.; ABRINI J. (2006).** Thymus essential oils: chemical composition and in vitro antioxidant and antibacterial activities. *Biochimie, Substances Naturelles et environnement, Congrès International de biochimies, Agadir*. P: 324-327.
- BRAVO L. (1998).** Polyphenols : chemistry, dietary sources, metabolisme, and nutritional signifiante . *Nutrition reviews*, 56(11), 317-333.
- BRIJITTE J, JAQUE B, NICOLAS B. (2002).** Chimie organique 17 éme edition. P : 225-230.
- BROGDEN K. A. (2005).** Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, 3, 38-50.
- BRUNETON J. (1993).** Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales. *Lavoisierc. Paris.ition,Dunod,Paris.P: 576-582.*

Références bibliographiques

BRUGNEROTTO J, LIZARDI J, GOYCOOLEA F.M., ARGÜELLES-MONAL W, DESBIERES J, RINAUDO M. (2001). « An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization». *Polymer*, 42, 3569-3580.

BRUL S, COOTE P. (1999). Preservative agents in foods: Mode of action and microbial resistance mechanisms. *Int. J. Food Microbiology*, 85, 426-452.

BRUNETON J. (1993). Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales. *Lavoisierc. Paris.ition, Dunod,Paris*. P: 576-582.

BRUNETON J. (1999). Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales. 3ème Ed *Tec&Doc. Paris*.P: 145.

BRUNETON, J.(2008). Pharmacognosie -Phytochimie, *plantes médicinales, 2eme éd.Paris*.

BRUNETON J. (2009). *Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales*. 4^e Ed : Lavoisier ; Paris. P: 1269.

BURT S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. *Review. Int. J. Food Microbiology*, 94, 223–253.

BURT S. (2007). Antibacterial activity of essential oils: potential applications in food [PhD thesis]. Utrecht University.

C

CARSON C.F., MEE B.J., RILEY T.V.(2002). Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salttoleranceassays and electronmicroscopy. *Antimicrob. Agents Chemother*, 46, 1914-1920.

CAVALLO J.D., FABRE R, JEHL F, RAPP C, GARRABE E. (2004). Bêtalactamines. *EMC Maladies infectieuses*, 1, 129-202.

CHAABANE A, AOUAMA K, BOUGHATTAS N.A., CHAKROUN M. (2009). Allergie aux bêtalactamines: mythe et réslités. Ed Elsevier Masson. *Médecine et maladies infectieuses*, 39, 278-287.

CHAKRAVARTY A. (1974). Coordination chemical. *Review*. P: 13

CHAO S.C., YOUNG D.G., OBERG C.J. (2000). Screening for Inhibitory Activity of Essential Oils on Selected Bacteria, Fungi and Viruses. *Journal of Essential Oil Research*, 12, 639-649.

Références bibliographiques

CHARPENTIER B, FLORENCE H.L, ALAIN H. (2008). Guide du préparateur en pharmacie. 3^{em} Edition Masson. P: 1358.

CHEN Y, SHAPIRA R, EISENSTEIN M. MONTVILLE T.J. (1997). Functional characterization of pediocin PA-1 binding to liposomes in the absence *acidilacticic with* a broad inhibitory spectrum. *Applied and Environmental Microbiology*. 61, 7, 26-43.

CHEN L, CHEN D, WU C. (2003). A new approach for the flocculation mechanism of Chitosan. *Journal of Polymers and the Environment*, 11, 87–92.

CHEN G.J., QIAO X, QIAO P.Q., XU G.J., XU J.Y., TIAN J.L., LIU X, YAN S.P. (2011). *J.Inorg. Biochem*. P: 105 -119.

CHENE C. (2002). Les acides organiques : les différents acides organiques utilisés dans les IAA et leur mécanisme d'action.

CHRIKI S, RIVOLLIER M, MICHAUD. (2006). Laboratoire de Génie chimique et biochimique, Université Blaise Pascal, Polytech Clermont Ferrand. *Viandes Prod. Carnés*, 27(6), 125-160.

CIMANGA K., KAMBU K, TONA L, APERS S, DE BRUYNE T, HERMANS N, TOTTE J, PIETERS L, VLIETINCK A.J. (2002). Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democrati Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology*, 79, 213–220.

COSENTINO S, TUBEROSO C.I.G., LISANO B. (1999). Sarinian Thymus essential oils. *Letters in Applied Microbiology*, 29, 130-135.

COTTON A, WILKINSON G. (1988). Advanced inorganic chemistery. fifth edition, *Journal Wiley ans sons*, 65, 85-88.

COTTER P.D., HILL C. (2003). Surviving the acid test: responses of Gram+ bacteria to low pH. *Microbiology. Molecular biology*, 67, 429-453.

COWAN M.M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12 (4), 564-582.

COX S.D., MANN C.M., MARKHAM J.L., BELL H.C., GUSTAFSON J.E., WARMINGTON J. R., WYLLIE S.G. (2000). The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, 88, 170-175.

Références bibliographiques

CRINI G, GUIBAL E, MORCELLET M, TORRI G, BADOT P.M. (2009) . « Chitine et chitosane. Préparation, propriétés et principales applications». Dans G. Crini, P.-M. Badot, & E. Guibal (Éds.), *Chitine et chitosane. Du biopolymère à l'application*. P: 19-54.

D

DARMADJI P, IZUMIMOTO M. (2002). Effect of Chitosan in No HK, Park NY, Lee SH, Meyers SP. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *Int J Food Microbiol* , 74, 65–72.

DE BILLERBECK V.G. (2007). Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. P:1252.

DEGRYSE A.C., DELPLA I, VOINIER M-A (2008). Atelier santé environnement : risques et bénéfices possibles des huiles essentielles-IGS- EHESP. P: 658.

DERWICH E, BENZIANE Z, TAOUIL R, SENHADJI O, TOUZANI M. (2010). A Comparative Study of The Chimical Composition of The Leaves Volatil Oil of *Juniperus phoenicea* and *Juniperus oxycedrus*. *Middl-East J.Res*, 5(5), 416-424.

DIEP D. B., SKAUGEN M, SALEHIAN Z, HOLO H, NES I.F. (2007). Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of Americ*, 104, 7, 38-49.

DIOP M. (2004). Thèse de doctorat spécialité chimie moléculaire université UCAD.

DILWORTH M.J., GLENN A.R. (1999). Problems of adverse pH and bacterial strategies to combat it. *Novartis Found.Symp*, 221, 4-14.

DONG, X. WANG, M. LIN, H. SUN, X. YANG, Z. GUO (2010), *Inorganica chimica acta. Chem*, 49, 2541.

DOMARACKY M, REHAK P, JUHAS S., KOPPEL J. (2007). Effects of selected plant essential oils on the Growth and development of Mouse preimplentation Embryos in vitro. *Physiol.Res*. 56, 97-104.

DORMAN H.J.D., DEANS S.G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. - *J. Appl. Microbiology*, 88, 308-316.

DRIDER D, FIMLAND G, HECHARD Y, MCMULLEN L.M., PREVOST H. (2006). The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : *MMBR*. 70, 2, 564-582.

E

ELKALAMOUNI C. (2010). Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées, thèse de doctorat, université de Toulouse.

EL RHAFFARI L. (2008). Catalogue des plantes potentielles pour la conception de tisane. Dans le cadre du projet 'empowering the rural poor by strengthening their identity , Income Opportunities and nutritional security through the improved use and marketing of neglected and underutilized species'. Faculté des sciences et techniques d'Errachidia.

ESSAWI T, SROUR, M.(2000). Screening of some palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *Journal Of Ethnopharmacology*, 70, 343-349.

EVANDRO L.S., JEFFERSON C.B., MARIA L.C; NELSON J.G.N; ANA C.V.C. (2009). Combined application of *origanum vulgare l.* essential oil and acetic acid for controlling the growth of *staphylococcus aureus* in foods, *Brazilian journal of microbiology*. 65, 147-258.

F

FALEIRO M.L. (2011). The mode of antibacterial action of essential oils: Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances; A. Méndez-Vilas Edition. P: 958.

FONG D, GAULIN C, ME-LINH L.E., SHUM M. (2011). Efficacité des agents antimicrobiens de substitution pour la désinfection des surfaces dures. *National collaborating center for environmental health*.

FOSTER J.W. (1999). When protons attack: microbial strategies of acid adaptation. *Microbiology*, 2, 170-174

FRANCHOMME, PENOËL. (1990). Aromatherapy for health professionals Hormonal essential oils A few essential oils which are hormonal but not neurotoxic . *Journal of essential oil research*, 13, 102-112.

G

GARRETT R.H., GRISHAM CHARLES M. (2000). Les transports membranaires. In *Biochimie*. Ed DeBoeck. P: 314.

GAGELLI E, DAMELIO, VALENSIN. (2001). *Biochemistry*, 2, 524-529.

Références bibliographiques

GILDO P. (2006). Précis de phytothérapie, Larousse *Encyclopedie MEMO*, Edition Alpen, p 3-4.

GONCALVES A.C., ALMEIDA R.C., ALVES M.A.O., ALMEIDA P.F. (2005). Quantitative investigation on the effects of chemical treatments in reducing *L. monocytogenes* populations on chicken breast meat . *J.Food Control*, 16, 617–622.

GUILLÉN M. D., MANZANOS M.J. (1998). Study of the composition of the different parts of a Spanish *Thymus Vulgaris* L. *plqnt. Food chemistry*, 63 (3), 373-383.

GUIRAUD J.P. (2003). Microbiologie alimentaire .*Ed Dunod, paris*. P: 68.

GUIRAUD J. P., ROSEC J.P. (2004). Pratique des normes en microbiologie alimentaire. *AFNOR*. P: 300.

H

HADDOUCHI F.A ESSAWI A. (2008). Les Huiles Essentielles, Utilisation Et Activités Biologiques, Application de Deux Aromatiques Plantes. *Les technologies de laboratoire*, 8, 20-27.

HAMMER K.A., CARSON C.F., RILEY T.V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86(6), 985-990.

HAMPSON G.J. (1998). Evidence for relative sea-level falls during deposition of the Upper Carboniferous Millstone Grit, South Wales. *Geological journal*, 33, 243-266.

HARBONE J.B. (1998). Phytochemical methods *a guide to moderns techniques of plants analysis*, 3rd edition. P: 412.

HELANDER IM, NURMIAHO-LASSILA EL, AHVENAINEN R, RHOADES J, ROLLER S.(2001): Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Int J Food Microbiology*, 71, 235–449.

HEUX L, BRUGNEROTTO J, DESBRIERES J, VERSALI M.F., RINAUDO M. (2000). «Solid state NMR for determination of degree of acetylation of chitin and chitosan». *Biomacromol*, 1, 746-751.

HSIAO C, SIEBERT K. (1999). Modeling the inhibitory effects of organic acids on bacteria. *Int. J. Food Microbiology*, 63, 15-45.

HSU S. T., E. BREUKINK, G. BIERBAUM, H. G. SAHL, B. DE KRUIJFF, R. KAPTEIN, N. A. VAN NULAND AND A. M. BONVIN (2003), NMR study of mersacidin

Références bibliographiques

and lipid II interaction dodecylphosphocholine micelles. Conformational changes are a key to antimicrobial activity. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 13110-13117.

HUANG H.W. (2006). Molecular mechanism of antimicrobial peptides: the origin of cooperativity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1758, 9, 1292-3002.

HUGUETTE M. (2008). La route des épices, aromatisants, condiments et mélange d'épices. *Ed : sang de la terre, Paris*. P: 190.

HYLDGAARD M, MYGIND T, LOUISE M.R. (2012). Essential oils in food preservation : mode of action, synergies . *Frontiers in Microbiology Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy* , 3, Article 12- 24.

I

IMAËL H, NESTOR B , RODOLFO J. (2012). Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties , *journal molecules*, 17, p 3989-4006; doi:10.3390/molecules17043989.

ISERIN INOUE S, ABE S. (2003). Comparative study of antimicrobial and cytotoxic effects of selected essential oils. *Larousse-Encyclopédie des plantes médicinales-Identifications, préparations, soins*. 2^{ème} édition. *Larousse-Bordas*. P: 335.

J

JACK R W., TAGG J.R., RAY B. (1995). Bacteriocins gram-positive bacteria. *Microbiological Reviews*, 59, 171-200.

JACOBY G.A., CHOW N, WAITES K.B. (2003). Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance. *J Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47, 559-562.

JARLIER V, NORDMANN P. (2000). Entérobactéries et bêta-lactamines. *In Freney J. Précis de bactériologie clinique. Ed Paris; ed ESKA*. P: 649-665.

JARLIER V. (1995). Antibiorésistance des bacilles à Gram négatif en réanimation. In l'infection acquise en réanimation. Ed Arnette Blackwell. P: 93-116.

JEAN D. (1974). Biochimie, numéro d'édition 6060.

JE J.Y., KIM S.K. (2006). Chitosan derivatives killed bacteria by disrupting the outer and inner membrane. *J. Agric. Food. Chem*, 54, 6629–33.

JEON Y.J., KIM S.K. (2001). Effect of antimicrobial activity by chitosan oligosaccharide N-conjugated with asparagine. *J Microbiol Biotechnol*, 11, 281–668.

Références bibliographiques

JONES G.A.T.A., MCALLISTER I.A.D., CHENG K.J. (1994). Effect of Sainfoin (Onobrychis viciifolia Scop) Condensed Tannins on Growth And Proteolysis by four Satains of Rumminal Bacteriat . *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (4), 1374-1378.

K

KALEMBA D, KUNICKA A. (2003). Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10, 813-829.

KASAAI M. R., ARUL J, CHIN S. L., CHARLET G. (1999). «The use of intense femtosecond laser pulses for the fragmentation of chitosan». *J. Photochem. Photobiol, A: Chem*, 120, 201-205.

KLAENHAMMER T.R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12, 1-3, 39-85.

KUMAR A.B.V., VARADARAJ M.C., GOWDA L.R., THARANATHAN R.N. (2007). Low molecular weight chitosans – preparation with the aid of pronase, characterization and their bactericidal activity towards *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Acta*, 1770, 495–505.

KUNLE O, OKOG U.N. (2003). Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from *Lippia multiflora* leaf extract. *Phytomedicine*, 10, 59-61.

KUETE V, PENLAP BENG V, ETOA F.X., MODJO S.L., BOGNE P., ASSOUB J.C., LONTSI D.(2004). Activités antimicrobiennes de l'extrait total et des fractions de jus de fruit de *Citrus medica* lin. (Rutaceae). *Pharmacie Médecine Traditionnelle Africaine*.

L

LAHLOU M. (2004). Methods to study the phytochemistry and bioactivity of the essential oils. *phytotherapy research*, 18, 435-448.

LAMBERT R.J.W., SKANDAMIS P.N., COOTE1 P.J. NYCHA G.J.E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 453-462.

LAMBERT T. (2007). Aminosides et bactéries à Gram négatif. AntibioGramme. *Courvalin* P. 2ème édition. P: 226-246.

Références bibliographiques

LANSING M, PRESCOTT J, HARLEY P, KLEIN D.A. (2003) .*Microbiologie*. 2eme Edition française : De boeck . P: 1164 .

LAVIGNE J.P. (2007). Effet des antibioques et mécanismes de résistance. Cours de bactériologie. Faculté de Médecine Montpellier-Nîmes.

LI-HUA Z, WEI-NA W, YUAN S, GUANG J. (2013). . Dots Coated VO₂ Arrays for Highly Durable Electrodes for *Li* and *Na* Ion Batteries”, *N. j Coord. Chem*, 66, 227.

LIM S.H., HUDSON S.M. (2003). Review of chitosan and its derivatives as antimicrobial agents and their uses as textile chemicals. *J Macromol Sci C – Polym Rev*, 43, 223–269.

LIS-BALCHIN M, BUCHBAUER G, HIRTENLEHNER T, RESCH M. (1998). Antimicrobial activity of Pelargonium essential oils added to a quiche filling as a model food system. *Letters in Applied Microbiology*.

LIU S. (2003). Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *Int. J. Food Microbiol*, 43, 258-298.

LUGASI A, HOVARI J, SAGI K.V., BIRO L. (2003). The Role of Antioxidant of the Flavonoids Luteolin. *Mini-Reviews In Medicinal Chemistry*, 9, 31-59.

M

MADIGAN M, MARTINKO J. (2007). Brock-Biologie des micro-organismes.11ème édition. *Pearson Education.France*, 1047, 586.

MANIKANDAMATHAVAN V.M., WEYHERMÜLLER T, PARAMESWARI R.P., SATHISHKUMAR M., SUBRAMANIAN V. (2014). The international journal for inorganic, organometallic and bioinorganic chemistry *Nair. Dalton Trans*, 43, 13018-13031.

MAHALAKSHMI N, RAMAN. (2013). Studies on DNA binding behaviour of biologically active *Spectrochim. Acta*, Part, 112, 198-212.

MALECKY M. (2006). Métabolisme des terpénoïdes chez les caprins, thèse de doctorat, AgroParisTech.

MANSOUR N., OUYED L, SADEG S. (2010). Détermination de l’activité antibactérienne de quelques huiles essentielles et leur application sur deux types de viande de dinde: commerciale et domestique. Thèse d’ingénieur. Université Mouloud Mammeri. Tizi Ouzou. 88.

Références bibliographiques

MARFAK A. (2003). Radiolyse gamma des flavonoides . étude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation des depsides ; these de Doctorat . Université de Limoges. P: 23-25.

MASSOUD, F.R. LOUKA W. XU R.S., PERKINS R., VICENTE J.H., ALBERING F.A., MAUTNER. (2011). Dna Cleavage By Structurally Characterized Dinuclear Copper. *Eur. J. Inorg. Chem*, 23, 34-69.

MAUTRAIT C, RAOULT R. (2009). la préparation : mode d'emploi (officine, sous-traitance et BP). 2eme édition. *Porphyre France* . P: 468.

MAYAUD L, CARRICAJA A, ZHIRI A, AUBERT G. (2008). Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics. *Lett Appl Microbiol*, 47(3), 167-73.

MCKEE L.H., NEISH L, POTTENGER A, FLORES N, WEINBRENNER K, REMMENG M. (2005). Evaluation of consumable household products for decontaminating retail skinless, boneless chicken breasts. *J Food Prot*, 68(3), 534-700.

MEBARKI N. (2010). Extraction de l'huile essentielle de thymus fontanesii et application à la formulation d'une forme médicamenteuse- antimicrobienne. These magister. Université de Boumerdes. P 124.

MEKAHLIA S. (2007). Le complexe chitosane-cuivre (II) : Synthèse, caractérisation et étude de l'effet de sa structure sur son activité antibactérienne. Mémoire de Magister, Département de Chimie.

METZNER M, GERMER J, HENGGE R. (2004). Multiple stress signal integration in the regulation of the complex sigma S-dependent csiD-ygaF-gabDTP operon in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol*, 51, 799-811.

MEYER A, DEIANA J, BERNARD A. (2004). Cours de microbiologie générale avec problèmes et exercices corrigés. 2eEd, *DOIN éditeurs, France*. P 204-205.

MICHIELS J, MISSOTTEN, FREMAUT D, DE SMET S, DIERICK N. (2007). In vitro dose-response of carvacrol, thymol, eugenol and trans-cinnamaldehyde and interaction of combinations for the antimicrobial activity against the pig gut flora, Departement Biowetenschappen e Landschapsarchitectuur, Hogeschool Gent, Vosseveld 270, 9000 Ghent.

Références bibliographiques

- MILADINOVIĆ D.L., ILIĆ B.S., KOCIĆ B.D., ĆIRIĆ V.M., NIKOLIĆ D.M. (2015).** Antibacterial Investigation of Thyme Essential Oil and Its Main Constituents in Combination with Tetracycline. *J Med Food*, 18(8), 935-7. doi: 10.1089.
- MING KONG, XI GUANG CHEN, KE XING, HYUN JIN PARK. (2010).** Chitosan; Antimicrobial activity; Mechanism; B.V. *International Journal of Food Microbiology*, 144, 151–63.
- MITROPOULOU G, FITSIOU E, STAVROPOULOU E, PAPA VASSILOPOULOU E, VAMVAKIAS M, PAPPA A, OREOPOULOU A, KOURKOUTAS Y. (2015).** Microb Ecol Health Dis. Composition, antimicrobial, antioxidant, and antiproliferative activity of *Origanum dictamnus* (dittany) essential oil. *Microb Ecol Health Dis*, 26, 10.3402/mehd.26543.
- MOHAMED A. EL-GAHAMI Z, KHAFADJI, AZZA M, NABWIA. (2004).** *Journal of inorganic and organometallic polymers*, 14, 117-129.
- MORETTI E, FELIPPONE F. (2000).** Acide citrique par fermentation. *Pressindustria SpA - Biassono (MI) Italie*, 6, 62– 76.
- MORENO-ROOHIGUEZ J.F., SOTOMENDIVIL E.A. (2006).** Chemical composition and fungicidal activity of the essential oil of *T.Vulgaris* against *Alternaria citri*. *Z.Gnosis*. V 4(16).
- MUKHERJEE P.K., SARIKHA G.S., SURESH B. (2002).** Antibacterial potential of two different Hypericum species available in India. *Phytother. Res*, 16, 692 -695.
- MIYAGUE A, RENATA E.F., MACEDO A, GIUSEPPE MECA B, RICHARD A. HOLLEY C, FERNANDO B. LUCIANO A. (2015).** Phenolic Compound Combinations on *Escherichia coli*. *LWT - Food Science and Technology*, 64, 333-336.
- MUZZARELI R. (1985).** Determination of the degree of acetylation of chitosans by first derivative ultraviolet spectrophotometry. *Carbohydrate Polymers*. P 461-472.

N

- NAGENDRA PRASAD M.N., SHANKARA BHAT S, SREENIVASA M.Y. (2010).** Antifungal activity of essential oils against *Phomopsis azadirachtae*-the causative agent of die-back disease of neem. *Journal of Agricultural Technology*, 6, 127-133.
- CRAGG GM, SNADER KM (2003).** Natural products Newman as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J. Nat. Prod.*66: 1022-1037.
- NGUZ K. (1996).** Evaluation de la dégradation des tannins. *Phytochimiques* .P 225-230.
- NIGUTOVA K. SERENCOVA L, PIKNOVA M, JAVORSKY P, PRISTAS P. (2008).** Heterologous expression of functionally active enterolysin A, class III bacteriocin from *Enterococcus faecalis*. in *Protein Expression and Purification*, 60, 20-40.
- NILSEN T, HOLO N. (2003).** Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 75-84.
- NO, H.K., MEYERS S.P. (1995).** « Preparation and characterization of chitin and chitosan--a review». *J. Aquatic Food Prod. Tech*, 4, 27-52.
- NO HK, PARK N.Y., LEE S.H., MEYERS S.P.(2002).** Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *Int J Food Microbiol*,74, 65–72.

O

- OSUNLAJA A, NDAHI N.P., AMEH J.A. (2009).** Synthesis, physico-chemical and antimicrobial properties , *African Journal of Biotechnology*, 8 (1), 004-011.
- OUELHADJ A, BADDAR K, DJENNANE D (2011).** Chemical composition and Antifungal activity of the *Myrtus communis* and *Pistacia lentiscus* essential oils of Mediterranean regions in laboratory medium and Strawberry fruit, Université Mouloud Mammeri, Tizi Ouzou.
- OURINI D., AGOUNI A. , A.ALAOUI MI., ALAOUI K., ALAOUI MA ET BELABBAS MA.(2007)** . Activité antifongique de l'acide oléique et des huiles essentielles de thymus saurjoides L. et de mentha pulegium L. comparé aux antifongiques dans les dermatoses mycosiques. *Phytothérapie*, 1, 6.
- OUSSALA M., CAILLET S., SAUCIER L, LACROIX M. (2006).** Antimicrobial effect of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat science*, 73, 236-244.

Références bibliographiques

OUSSALAH M. (2007). Inhibitory effects of selected plant essential oils on *Pseudomonas putida* growth, a bacterial spoilage meat. *Meat Science*, vol 73, 236-244.

P

PAULI A, KNOBLOCK K. (1987). inhibitory effect of essential oil component on growth of food-contaminating fungi. P 10-13.

PEREZ D. (2009). Impact of volatile phenols and their precursors on wine quality and control measures of *Brettanomyces/Dekkera* yeasts". Extrait et traduit de l'anglais à partir de *Eur Food Res*.

PERRETT S, WHITFIELD P.J., SANDERSON L, BARTELETT A. (1995). The plant molluscicide *Millettia rhortningii* (leguminosae) as a topical antischistosomal agent. *journal of Ethnopharmacology*, 47, 49-54.

PERRONNE C. (1999). Maladies infectieuses university press, Oxford.

PIBIRI (2005). Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de doctorat. EPFL: Ecole Polytechnique Fédérale. Lausanne (Suisse). p161.

PIERRE F, ROGER J, DANIEL P , JOLLOIS R. (1990) . Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles. P : 446 .

PIOCHON (2008). étude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore laurentienne, composition chimique, activités pharmacologiques et hémi-synthèse, mémoire de maîtrise, université du Québec à Chicoutimi.

PINTO E, PINA-VAZ C, SALGUEIRO L, GONÇALVES MJ, COSTA-DE-OLIVEIRA S, CAVALEIRO C, PALMEIRA A, RODRIGUES A, MARTINEZ-DE-OLIVEIRA(2006). Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *J.J Med Microbiol*, 55(Pt 10), 1367-73.

R

RABEA EI, BADAWY MET, STEVENS CV, SMAGGHE G, STEURBAUT W (2003). Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*, 4 , 1457–65.

RAHYOUR K., (2002). Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium*

Références bibliographiques

fortuitum. UFR : Biologie cellulaire et moléculaire appliquée à l'environnement et la santé. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, Faculté des Sciences, Dhar Mehraz, Fès.

RAJALAKSHMI, T. WEYHERMÜLLER, M. DINESH, B.U. NAIR, J.(2012). Copper (II) complexes of terpyridine derivatives: A footstep towards development of antiproliferative agent for breast cancer, *Inorg. Biochem*, 117, P 48.

RASOOLI, I (2007): food preservation – *a biopreservative approach foodglobal science books* , 1(2), 111,

RICHTER G., (1993). Metabolisme des végétaux (physiologie et biochimie). Ed : presses polytechnique et universitaire Romandes. P 321.

RIFFEL A, MEDINA L-F, STEFANI V, SANTOS R-C, BIZANI, BRANDELLE. (2002). *In vitro* antibacterial Activity of a new series of 1, 4- naphthaquinones. *Brazilian journal of medical and biological research*, 35(7), 811-818.

RIGO A, CORAZZA A, DI PAOLO M.L., ROSETTO M, UGOLINI R, SCARPA M. (2004). *Journal of inorganic biochemistry*, 98, 1459-1501.

RINODAU M. (2006). Chitin and chitosan properties and application. *Progress in sciencepolymer*, 31, 603-632.

RODRIGUES A, OLIVEIRA S. (2003). Antifungal activity of oregano oils (*Lippia graveolens* and *Origanum virens*) on dermatophyte species. *Clin Microbiol Infec*, 9 (1), 222-230.

ROJAS A, HERNANDEZ L, PERRADA-MIRRANDA R, MATG R. (1992). Screening for antibacterial activity of crude drug extract and pure natural products from Mexican medicinal plants. *journal of Ethnopharmacology*, 35, 275-283.

ROLLER S, COVILL N. (1999). The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice, *Int. J. Food Microbiol*, 47, 67 – 77.

ROQUEBERT M.F. (2002). Les contaminants biologiques des biens culturels. *Edition Elsevier. Paris*, 419.

ROTA M.C., HERREA A, MARTINEZ C. (2008). Antibacterial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *T.zygis* and *T.lymolis* essential oils. *Food control*, 19, 681-687.

Références bibliographiques

RUNETON J. (1993). Pharmacognosie Phytochimie Plantes médicinales. 2eme édition, Lavoisier, P 41-54.

S

SAGOO S, BOARD R, ROLLER S. (2002). Chitosan inhibits growth of spoilage micro-organisms in chilled pork products. *Food Microbio*, 19, 175-182.

SANTINI C, PELLEI M, GANDIN V, PORCHIA M, TISATO F, MARZANO C. (2014). Advances in copper complexes as anticancer agents. *chem. rev*, 114 (1), 114-815.

SARNI-MANCHADO P, CHEYNIER V. (2006). Les polyphénols en agroalimentaire. Ed. Tec & Doc, Paris, p : 2-10.

SHAHRAM SHEKARFOROUSH S, BASIRI S, EBRAHIMNEJAD H. (2015). Effect of chitosan on spoilage bacteria, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* in cured chicken meat Hosseinzadeh Department.

SCHWÄMMLE L, ELEONORA WINKELHAUSEN ,SLOBODANKA KUZMANOVA AND WALTER STEINER. (2001). Isolation of Carvacrol Assimilating microorganisms Blagica Austria, 56, 14-23.

SENATORE F. (1996). Influence of harvesting time on yield and composition of the essential oil of a thyme (*Thymus pulegioides*) growing wild in Campania. *Agric. Food. Chem.* 44: 1327-1332.

SHAHIDI F, ARACHCHI JKV, JEON Y-J. (1999). Food applications of chitin and chitosans. *Trends Food Sci. Technol*, 10, 37-51.

SHAHIDI F, ABUZAYTOUN R. (2005). Chitin, chitosan, and co-products: chemistry, productions, applications, and health effects. *Adv. Food Nutr. Res*, 49, 93-135.

SINGH S.B., BARRETT J.F. (2006). Empirical antibacterial drug discovery –foundation in natural products. *Biochem. Pharmacol*, 71, 1006-1015.

SINGLETON P. (2005). Bactériologie pour la médecine, la biologie et les biotechnologies. Ed Dunno, 6^{ème} édition. *Sciences SUP*, 15, 464-467.

SIPAILIENE A, VENSKUTONIS P.R, BARANAUSKIENE R ET SARKINAS A. (2006). Antimicrobial activity of commercial samples of thyme and major oils. *Journal of Essential Oil. Research*, 18, 698-703.

Références bibliographiques

- SMITH C.K., MOORE C.A., ALAHI E.N., SMART, Â.T., HOTCHKISS S.A. (2000).** Human skin absorption and metabolism of the contact allergens, cinnamic aldehyde and cinnamic alcohol. *Toxico. Appl. Pharmacol*, 168, 189-199.
- SOKMEN A, GULLUCE M, AKPULAT H.A. (2004).** The *in vitro* antibacterial and antioxidant activity of the essential oils and methanol extracts of endemic thymus spathulifolius. *Food control*, 15, 627-634.
- SUHR K.I. ET NIELSON P.V. (2003).** Antifungal activity of essential oil evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi. *Journal of Applied Microbiology*, **94**, 665-674.
- SUYATMA N.E. (2006).** Développement de films Biodegradable à base de chitosane : Etude du Mélange Chitosane/PLA, de la Plastification et de la Compatibilisation. Thèse de Doctorat, Université de REINS-CHAMPAGNE ARDENE.
- TAGG, J.R., DAJANI, A.S., WANNAMAKER, L.W. (1976).** Bacteriocins of gram positive bacteria. *Bacteriol.Rev*, **40**, 722-756.
- TIDJANI RAHMOUNI N, BENSIRADJ H, DJBBAR S, BENALI O. (2014).** *J. Mol. Struct*, 1075, 254-263.

T

- TAKASHI M. (2008).** Hideo Shinagawa, Takashi Hishida BMC. *Molecular Biology*, 9, 27.
- TIDJAN-RAHMOUNI N. (2014).** These doctorat USTHBS synthese,caracterisation,comportement elechtrochimique et activité biologique de complexes mixtes de metaux de transition avec l'isonitroacetohenone et un acide amine.
- TOLAIMATE A., J. DESBRIERES, M. RHAZI, A.ALAGUI, M. VINCENDON ET P. VOTTERO. (1999).** «On The Influence of Deacetylation Process on The Physicochemical Characteristics of Chitosan from Squid Chitin». *Polymer*, 41, 2463-2469.
- TOLAIMATE A, DESBRIERES J, RHAZI M, ALAGUI A. (2003).** Contribution to the preparation of chitins and chitosans with controlled physico-chemical properti. *Polym*, 44, 7939-7952.
- TSAI GJ, SU WH. (1999).** Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*. *J Food Prot*, 62, 239-43.

Références bibliographiques

TUMMALAPALLI KIRAN A, VUPPALAPATI GIRI PRASANTH A, BALAMURALI A, VASAVI B, PUNNAGAI MUNUSAMI B. (2015). *Journal of Inorganic Biochemistry*, 149, 49-58.

TUMMER M, EKINCI D, TUMER F. (2007). *Spectrochim Acta Part A*, 67, 916-929.

TURGEON M. (2001). Profil des produits forestiers-Première transformation-huiles essentielles. *Ministère des ressources naturelles*.

TWOMEY D, ROSS R.P., RYAN M, MEANEY B., AND HILL C. (2002). Lantibiotics produced by lactic acid bacteria structure, function and applications. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **82**, 1-4, 165-85.

U

ULTEE A, KETS E.P., SMID E.J. (1999). Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol*, 65(10), 460-610.

ULTEE R., SLUMP A., STEGING G., & SMID E. J., (2000). Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. *Journal of Food Protection*, 620-624.

V

VALERO M., FRANCÉS E. (2006). Synergistic bactericidal effect of carvacrol cinnamaldehyde or thymol and refrigeration to inhibit *Bacillus cereus* in carrot broth. *Food Microbiology*, 23, 68-73.

VANIER P. (2006). Le thym au fil du temps. Usage culinaire, conservation, jardinage biologique. *Ecologie et environnement*.

VIGNEP. (1987). la France et ses productions aromatiques végétales actuelles. *parfums, cosmétiques, arômes*, 78, 97-103.

W

WALKER W.R., CSIRO. (1980). symposium on the importance of copper in biology and medicine. *CSIRO National Measurement Laboratory*, Sydney.

WANG Y., HENZ N.L., GALLAGHER S., WISHART AND VEDERAS J.C. (1999). Solution divergens. *Journal of Bacteriology*, **177**, 11, 3143-9.

WILLEM J.P. (2010). Les huiles essentielles. *Médecine d'Avenir*. (12^{ème} Editions) Edition du Dauphin.

Références bibliographiques

WOLFF M., JOLY-GUILLOU M.L., PAJOT O. (2009). Les carbapénèmases. *Comparative review of carbapenemes. Reanimation*, 18, S199-S208.

X

XU J., ZHOU F., JI B.P., PEI R.S., XU N. (2008). The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Lett Appl Microbiol*, 47(3), 174-190.

Z

ZAICA L. L. (1988). Spices and Herbs - Their Antimicrobial Activity and Its determination. *Journal of Food Safety*, 9(2), 97-118.

ZEMMOURI H. (2008). Utilisation du chitosane comme agent flocculant dans le traitement des eaux. Mémoire de Magister, Laboratoire de Biotechnologie Environnementale et Génie des procédés, Ecole Nationale polytechnique, Alger, Algérie.

ZHANG S.M., SHUANG C., DONG D.S., LIU M.M.F., CHOI, J. (2004). Photochem. Photobiol, *Journal of the Chilean Chemical Society*, 74, 127–134.

ZHENG L.Y., ZHU J.F. (2003). Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *Carbohydr Polym*, 54, 527–30.

ZIVANOVIC D. (2015). Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality, 153–181.

Les annexes

Annexe 1 : les différent milieux de culture

La gélose Mueller-Hilton agar

Composition du milieu de culture :

Infusion de viande de bœuf.....	2g
Hydrolysate de caseine.....	17,5g
Amidon	1,5g
Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000ml
PH 7,4	

Sabouraud :

Composition du milieu de culture :

digestion enzymatique de caséine	10g
dextrose	40g
Gélose.....	15g

Annexes

Annexe 2 :



Annexes 3 :



Annexe 4 :

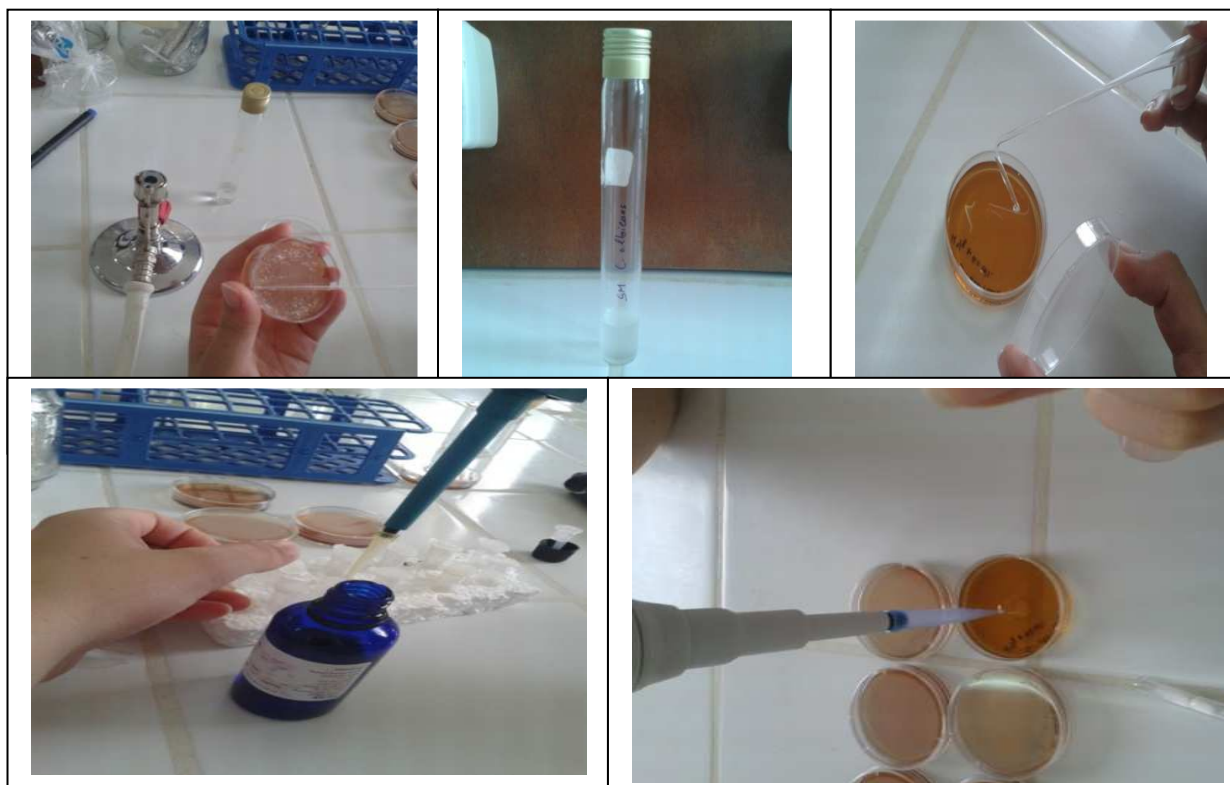


Figure : Photos illustrant l'ensemble des étapes effectuées pour la méthode des puits
Photos illustrant l'ensemble des étapes effectuées pour la méthode des puits

Annexe 5 :

Tableau 1: Effet de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* sur les souches microbienne

Dilution (%)	Diamètre d'inhibition (mm) correspondant à chaque micro-organisme			
	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>
100	25	30	60	60
50	20	28	30	29
25	18	26	25	20
12,5	18	20	20	10
06,25	15	15	13,5	04

Annexes

Tableau 2 : Effet de l'acide citrique sur les souches microbiennes

A.citrique (%)	<i>E. coli</i> (mm)	<i>B. cereus</i> (mm)	<i>C. albicans</i> (mm)
10	14	13	08
08	11	11	07
06	10	10	06
04	09	07	00
03	02	00	00

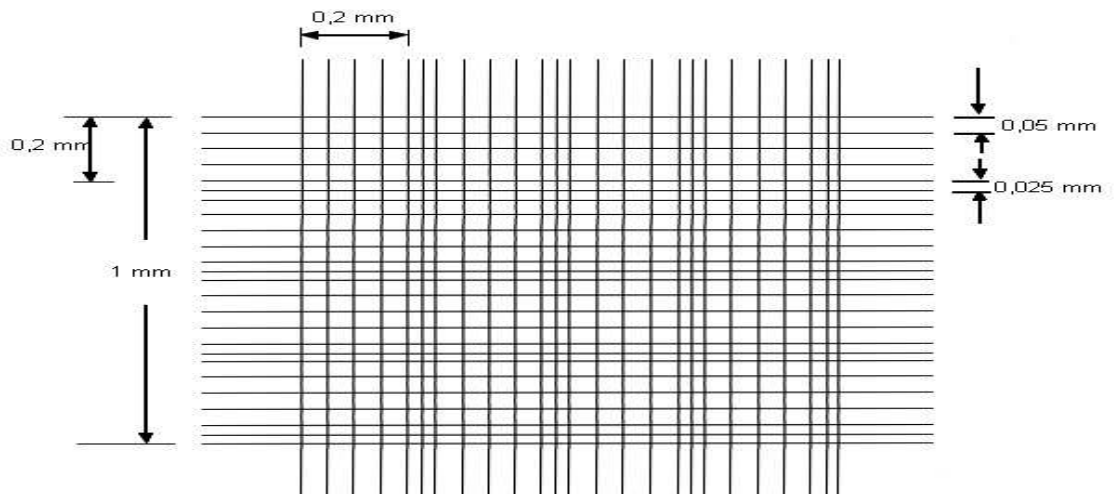
Tableau3 : Diamètres des zones d'inhibition produites par le complexe chimique sur les souches microbiennes testées

	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>
C 01	00	00	00	00
C 02	00	00	00	00
C03	07	00	00	00
C04	00	00	00	00
C05	00	00	09	00
C06	00	10	00	00

Tableau 4 : Diamètres des zones d'inhibition produites par le chitosane sur les souches microbiennes testées

	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>
01H 30	00	00	00	00
02H00	08	09	10	Retardement de la croissance
02H30	09	11	13	Retardement de la croissance
03H00	07	08	07	Retardement de la croissance

Annexe 6 : mode opératoire de la cellule de Thoma



Le quadrillage total

- ▀ volume : 0,1 μ l
- ▀ côté : 1 mm
- ▀ hauteur : 0,1 mm

16 grands carrés contenant chacun 16 petits carrés

+ 4 groupes de 3 lignes horizontales + 4 groupes de 3 lignes verticales.

- ▀ Côté de chaque petit carré : 0,05 mm
- ▀ Volume délimité par 1 petit carré : 0,00025 μ l
- ▀ Volume délimité par 16 petits carrés : 0,004 μ l