

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE MOULOUE MAMMERI DE TIZI OUZOU
FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE-MICROBIOLOGIE



MEMOIRE

De fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de master académique

Filière : Biotechnologie

Spécialité : Biotechnologie microbienne

Thème

Etude de l'activité antibactérienne de deux huiles essentielles de
Lavandula angustifolia Mill et *Pinus sylvestris* L et leur potentiel
Synergique vis à vis des souches pathogènes.

Travail réalisé par :

Melle : AIMENE Ryma

Melle : BELLIL Hayat

Devant le jury :

PRESIDENTE : Mme ASMANI K.

Maitre de conférences B à l'UMMTO

PROMOTEUR : Mr OUELHADJ A.

Maitre de conférences A à l'UMMTO

EXAMINATRICE : Mme TALEB K.

Maitre de conférence B à l'UMMTO

Remerciements

Ces travaux de recherche ont été réalisés grâce au Laboratoire pédagogique de Microbiologie de l'UMMTO .

*On remercie **Mr OUELHADJ** : Maitre de conférences A qui a accepté de diriger ce projet, vos conseils et orientations nous ont permis de mener à bien cette passionnante étude à vos côtés, on vous remercie également de nous avoir responsabiliser tout au long de notre travail.*

*On remercie Madame **ASMANI.k** : maitre de conférences B, de nous avoir fait l'honneur de présider notre jury.*

*Nos remerciements vont également à Madame **TALEB.k** : maitre de conférences B, d'avoir accepté de faire partie de notre jury, examiner et participer à l'évaluation de notre travail.*

On remercie également tout le personnel du laboratoire de Microbiologie de l'UMMTO de nous avoir accueillis au sein de leur équipe, particulièrement Sonia et Djidji.

*Nous tenons aussi à exprimer nos sincères remerciements et notre profonde gratitude à tous ceux qui ont contribué de près pour la réalisation de ce travail, en particulier **Mr TITOUCHE**, **Mr HOUALI**, pour leur gentillesse et leurs précieux conseils.*

Nos plus profonds remerciements vont à nos parents. Tout au long de notre cursus, ils nous ont toujours soutenu, encouragé et aidé. Sans eux on n'y arrivera jamais à être les personnes qu'on est. Qu'ils trouvent, dans la réalisation de ce travail, l'aboutissement de leurs efforts ainsi que l'expression de nos plus affectueuses gratitudees.

On saurait terminer cette série de remerciement sans penser à tous ceux qui de près ou de loin nous ont aidé et encouragé au cours de la réalisation de ce travail, recevez nos remerciements sincères.



Dédicaces

*Je dédie ce modeste travail qui est le fruit
récolté après tant d'années d'efforts :*

- ♥ *A mon père Saïd, le premier et le dernier homme de ma vie, source d'amour, d'affection, de générosité, et de sacrifices. Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour et l'admiration que je porte au grand homme que vous êtes. Tu étais là près de moi pour me soutenir, m'encourager et me guider avec tes précieux conseils. Que ce travail soit le témoignage des sacrifices que vous n'avez cessé de déployer. Que Dieu le tout puissant, vous préserve et vous accorde santé, longue vie et bonheur.*
- ♥ *A la prunelle de mes yeux : ma mère Karima, source de ma vie, d'amour et de tendresse qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Vous m'avez toujours aidé par vos conseils et vos sacrifices. Vous avez consacré votre noble existence à bâtir la mienne. Puisse Dieu le tout puissant vous accorder meilleure santé et longue vie.*
- ♥ *A mes frères et sœurs, je vous souhaite beaucoup de réussite dans votre vie. Que Dieu vos garde et illumine vos chemins.*
- ♥ *A toute ma famille maternelle et paternelle.*
- ♥ *A ma chère amie et binôme Ryma, merci aux bons moments qu'on partagé afin de donner naissance à ce projet.*
- ♥ *A mes meilleures amies, Yamina, Celia, Ouiza, Ania, Sophie, Reziqa, Thiziri, ainsi qu'à tous mes amis du groupe ****Biotechnologie microbienne**** merci pour les bons moments qu'on a partagé ensemble, je vous aime tous.*
- ♥ *Et enfin je remercie infiniment tous mes proches, amis et collègues qui m'ont aidée, soutenue et supportée durant cette période délicate.*



Hayat



Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

*A mes parents qui ont toujours cru en moi qui ont toujours été
présents avec leur soutien, leur patience, et leur encouragement
durant tout mon parcours scolaire*

*A ma sœur **Celia** et mon frère **Yanis** qui n'ont jamais arrêté de
m'encourager*

*A **BEKHTIAR Koceila** qui m'a accompagné toutes ces
circonstances qui étais présent pour m'écouter, m'encourager et
m'orienter*

*A **ALI YAHIA Lyes** pour ton aide, ta gentillesse et ta patience*

*A mes amies : **Taous, Widad, Lydia** et surtout **Safia**.*

*Sans oublier mon binôme **Hayet** qui était toujours présente, je te
remercie*

*A tous ce qui mon aidé de près ou de loin pour la réalisation de
ce travail je vous remercie.*

A tous les êtres chers à mes yeux que je n'ai pas évoqués

*A tous ceux et toutes celles que j'ai involontairement omis de
citer et qui n'en demeurent pas moins chers.*



Ryma

Liste des abréviations

HE : Huile Essentielle

ATTCC : American Type Culture Collection

CPG : Chromatographie Phase Gazeuse

MH : Muller Hinton

GN: Gélose nutritive

BHIB : Brain Heart Infusion Broth

DMSO : diméthylsulfoxyd

UFC : Unité Formant Colonies

DO : Densité Optique

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CMB : Concentration Minimale Bactéricide

V/V : Volume/Volume

CMB : Concentration Minimale Bactéricide

ATB : Antibiotique

GC-SM : Chromatographie en phase Gazeuse-Spectrométrie de Masse

PAM : plantes aromatiques et médicinales

Liste des tableaux

Tableau I : Caractéristiques des souches bactériennes utilisées.....	23
Tableau II: Description des huiles essentielles testées.....	23
Tableau III : Les antibiotiques utilisés.....	24
Tableau IV : Milieux de culture.....	24
Tableau V : Valeurs des dilutions déterminant la CMI.....	28
Tableau VI : Résultats de l'aromatogramme de <i>Lavandula angustifolia Mill</i>	31
Le tableau VII: Résultats de l'activité antimicrobienne du <i>Pinus sylvestris L</i> sur les souches testées.....	32
Tableau VIII: Diamètre des zones d'inhibition des témoins positifs.....	34
Tableau IX: Résultats de l'activité antibactérienne de la combinaison des deux huiles essentielles <i>Lavandula angustifolia Mill</i> et <i>Pinus sylvestris L</i>	36

Liste des figures

Figure 1 : Quelques exemples des composants des huiles essentielles.....	7
Figure 2 : Procédé d'extraction d'une huile essentielle par entraînement à la vapeur d'eau.....	9
Figure 3: L'extraction au CO2 supercritique.....	11
Figure 4 : L'hydrodistillation.....	12
Figure 5 : Plante de lavande fine.....	18
Figure 6 : Plante de Pin sylvestre.....	20
Figure 7 : Photographies des souches testées après coloration de Gram au microscope photonique au grossissement 100.....	29
Figure 8 : Photographies correspondants aux résultats de l'activité antibactérienne de l'HE <i>Lavandula angustifolia Mill</i>	30
Figure 9 : photographies des résultats de l'activité antibactérienne de l'HE <i>Pinus sylvestris L</i>	31
Figure 10: Résultats du test de témoin négatif (DMSO) réalisé sur l'ensemble des souches..	32
Figure 11 : Résultats du test témoin positif réalisé avec les ATBs sur l'ensemble des souches.....	33
Figure 12 : Résultats de la combinaison des deux HES à (75% H1+25% H2).....	36
Figure 13 : Résultats de la combinaison des deux HES à (25% H1+75% H2).....	37
Figure 14 : Résultats de la combinaison des deux HES à (50% H1+50% H2).....	37
Figure15 : Microdilution en série réalisées avec l'huile <i>Lavandula angustifolia Mill</i> sur la souche d' <i>E.coli</i> ATCC25922.....	39
Figure16 : Microdilution en série réalisées avec la combinaison (25% <i>Lavandula angustifolia Mill</i> et 75% <i>Pinus sylvestris L</i>) sur <i>B.cereus</i> ATCC14579.....	39
Figure17 : Résultats de la CMB obtenu pour la souche d' <i>E. Coli</i> ATCC25922.....	40

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

1. Introduction.....	1
Première partie : Synthèses bibliographiques	
Chapitre I : Généralités sur les huiles essentielles	
I. Définition.....	3
1. Les huiles essentielles.....	3
II. Aromathérapie.....	3
III. Chémotype ou chimiotype.....	3
IV. Localisation des huiles essentielles dans la plante.....	4
V. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles.....	4
VI. Les composants chimiques des huiles essentielles.....	5
1. Les Terpènes.....	5
2. Les Alcools.....	5
3. Les Phénols.....	5
4. Les Phénols méthyle-éthers.....	5
5. Les Oxydes.....	6
6. Les Aldéhydes.....	6
7. Les Esters.....	6
8. Les Cétones.....	6
9. Les Lactones.....	6
10. Les Coumarines.....	6
11. Les Composés soufrés.....	6
VII. Facteur influençant la composition chimique des huiles essentielles.....	7
VIII. Méthodes d'extraction des huiles essentielles.....	8
1. La distillation ou l'entraînement à la vapeur.....	8
2. Distillation sèche.....	9
3. Expression à froid.....	10
4. Extraction par les solvants.....	10
❖ Autres méthodes d'obtention des huiles essentielles.....	10
1. Percolation ou hydrodiffusion.....	10
2. Extraction au CO2 supercritique.....	10
3. Enfleurage.....	11
4. Hydrodistillation.....	11
4.1. Hydrodistillation sous pression.....	11
4.2. Le système de thermopompage.....	11
4.3. Turbodistillation.....	11
4.4. Hydrodistillation par micro-ondes.....	12
X. Procédure par épuisement.....	12
XI. Méthodes d'analyse des huiles essentielles.....	12

1. Chromatographie en phase gazeuse(CPG)	13
XII. Conservation des huiles essentielles	13
XIII. Activité biologique des huiles essentielles.....	13
1. L'activité antimicrobienne	13
2. Activité insecticide	14
3. Activité antioxydantes	14
4. Activités anthelminthiques	14
5. Activité sur les affections respiratoires et antiseptique	14
XIV. Mécanismes d'action des huiles essentielles	15
1. Cytotoxicité.....	15
2. Phototoxicité	15
XV. Précautions d'emploi	16
XVI. Intérêts et rôles des huiles essentielles	16

Chapitre II : Généralités sur les plantes étudiées

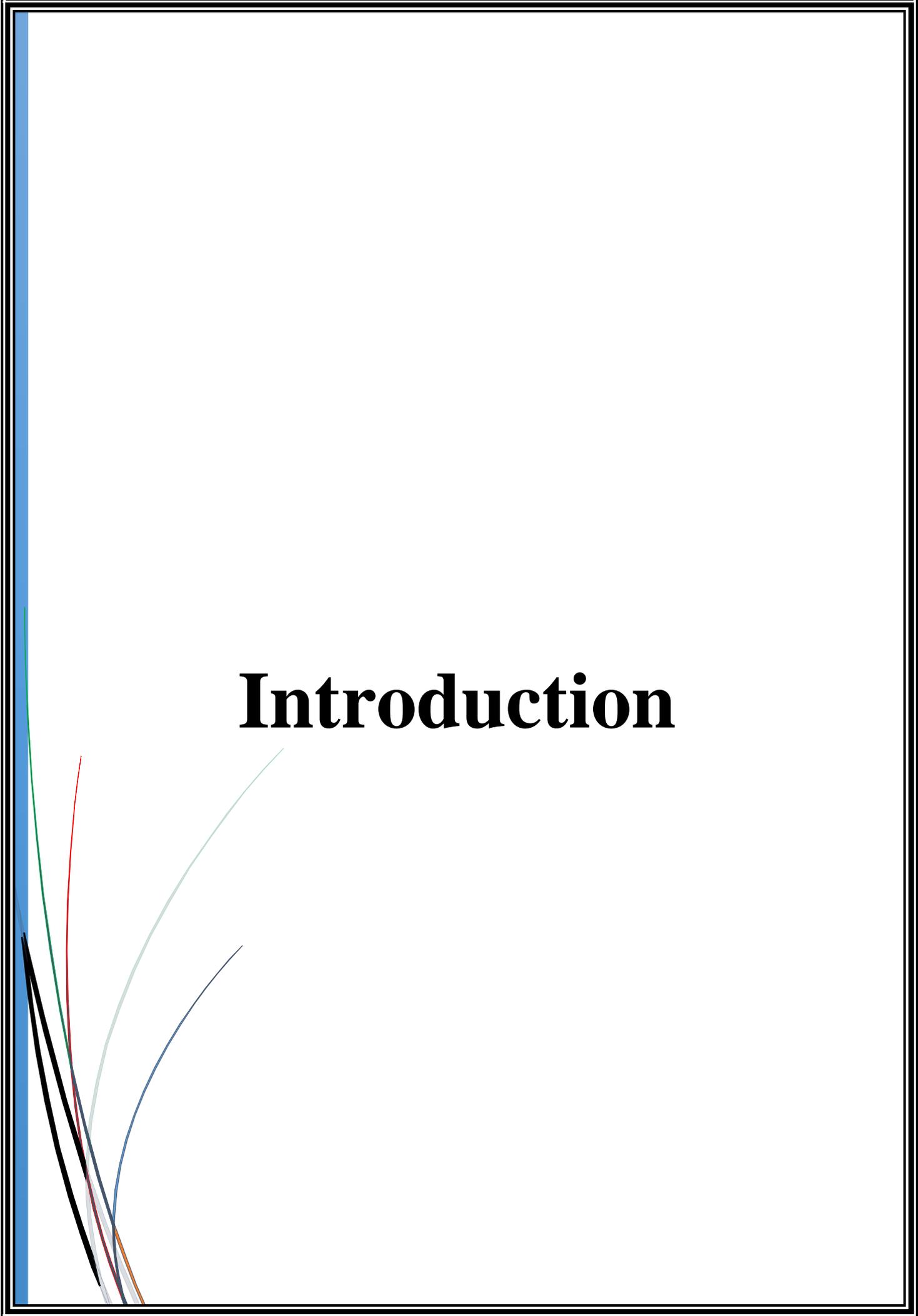
I. <i>Lavandula angustifolia</i> Mill	18
1. Description de la plante	18
2. Historique :	18
3. Description botanique.....	18
4. Classification :.....	19
5. L'huile essentielle de la lavande fine	19
6. Propriétés des huiles essentielles.....	19
7. Composition.....	20
II. <i>Pinus sylvestris</i> L.....	20
1. Description de la plante	20
2. Historique	20
3. Descriptions botaniques.....	21
4. L'huile essentielle de pin sylvestre	21
5. Propriétés	21
6. Constituants responsables des principales propriétés.....	21
7. Composition.....	21
8. Classification.....	22

Deuxième partie : Etude expérimentale

I Matériel et méthodes

I. Matériel	23
1. Matériel microbiologique	23
2. Les huiles essentielles testées	23
3. Les antibiotiques utilisés	24
4. Les milieux de culture	24
5. L'Emulsifiant	24
6. Appareillage.....	24
II. Méthodes.....	25
1. Révérification et confirmation de la pureté des souches	24

1.1 Principe de la méthode.....	25
2. Revivification des souches.....	25
3. Préparation et standardisation de la suspension bactérienne	25
4. Etude de l'activité antimicrobienne des deux huiles essentielles	26
4.1. Aromatogramme.....	26
4.1.1. Lecture	27
4.2. Méthode de microdilution en milieu liquide.....	27
4.3. Etude de la combinaison des huiles essentielles <i>Lavandula angustifolia</i> Mill et <i>Pinus sylvestris</i> L	28
Troisième partie : Résultats et discussion	
III. Résultats	29
1. Résultats de la revérification de la pureté des souches	29
2. Résultats de l'activité antimicrobienne des deux huiles essentielles	29
2.1. <i>Lavandula angustifolia</i> Mill.....	30
2.2. <i>Pinus sylvestris</i> L.....	31
3. Résultats de la combinaison des deux huiles essentielles	35
4. Résultats de la CMI.....	39
5. Résultats de la CMB.....	41
IV. Discussion	41
Quatrième partie : Conclusion et perspectives	
Conclusion.....	47
Perspectives	49
Références	
Annexes	
Résumé	



Introduction

Introduction

De nos jours, la médecine moderne utilise les vertus thérapeutiques des huiles essentielles et de leurs constituants. En effet, de nombreux composés volatils sont aujourd'hui des ingrédients courants des préparations pharmaceutiques. Le thymol, par exemple, est employé en soins dentaires pour ses propriétés antiseptiques ou encore l'eugénol pour ses propriétés analgésiques (Pauli, 2001).

Pour tenter de trouver de nouveaux remèdes au phénomène de la résistance bactérienne aux antibiotiques (ATB) qui augmente régulièrement que ce soit en milieu communautaire ou hospitalier et constitue un véritable problème de santé publique. La communauté scientifique s'est récemment tournée vers les constituants des huiles essentielles, car un nombre non négligeable de composés volatils, ont montré des activités pharmacologiques remarquables contre les maladies comme le cancer (Modzelewska et al., 2005).

Les huiles essentielles constituent donc une source intéressante de nouveaux composés dans la recherche de molécules bioactives.

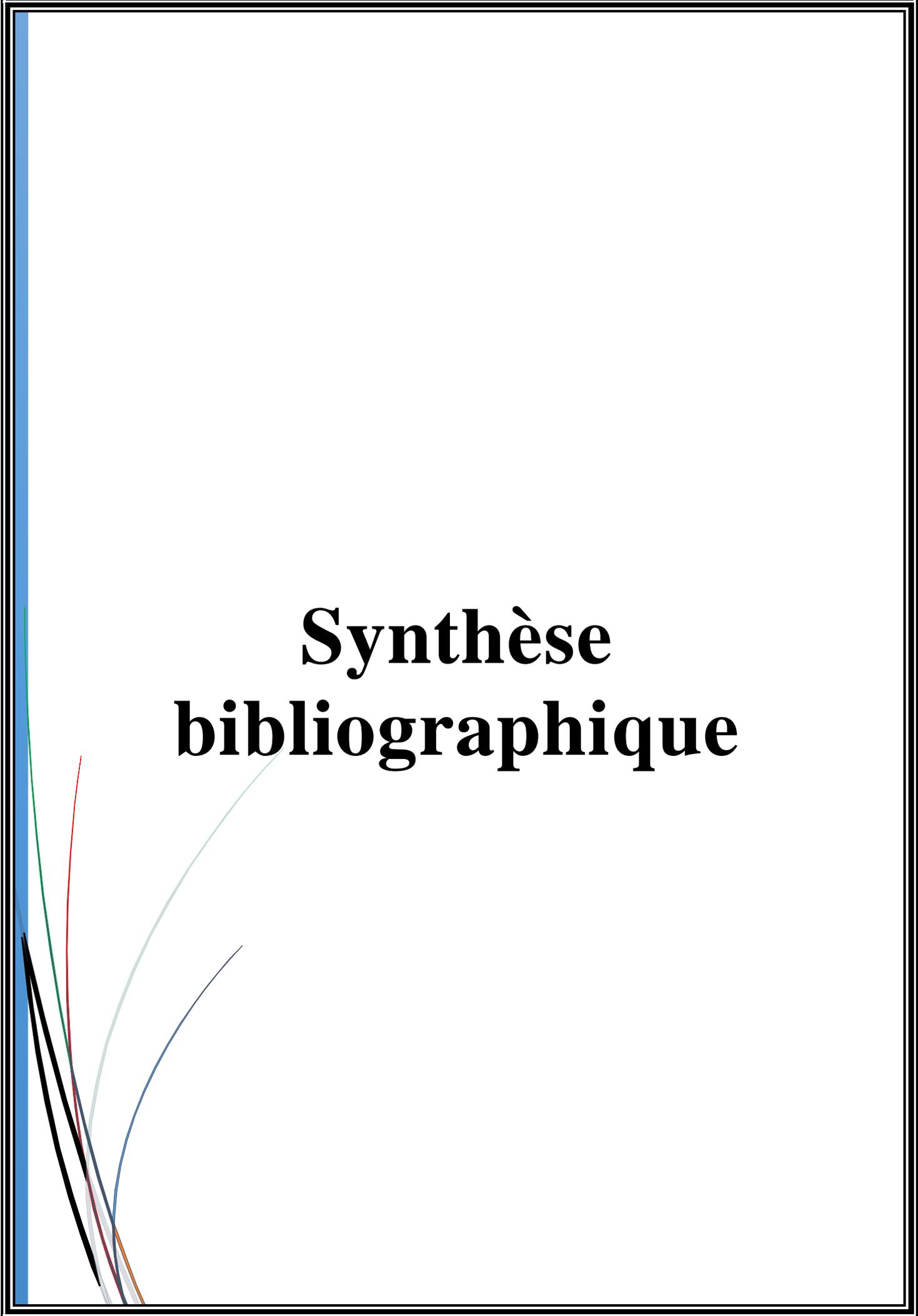
Ce travail porte sur l'étude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de deux plantes aromatiques et médicinales *Lavandula angustifolia* Mill et *Pinus sylvestris* L vis-à-vis de huit souches bactériennes pathogènes référencées: *Enterococcus faecalis* WDCM 00009, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Enterococcus faecalis* ATCC 10541, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Citrobacter freundii* ATCC 8090 dans le but de rechercher de nouveaux produits bioactifs naturels.

En vue de rendre compte de la démarche scientifique adoptée, ce manuscrit comportera quatre parties :

Dans une première partie, une synthèse bibliographique sera présentée sur les plantes en santé humaine, ainsi la description des huiles essentielles utilisées dans ce travail.

La deuxième partie du manuscrit présentera le matériel et les méthodes utilisés, notamment la revérification de la pureté puis revivification des souches, ensuite l'étude de l'activité antibactérienne des deux huiles par deux méthodes différentes confirmée par aromagramme et par microdillution et comparé à un témoin positif (antibiogramme) et un témoin négatif (DMSO). L'évaluation de la combinaison de deux huiles terminera cette deuxième partie.

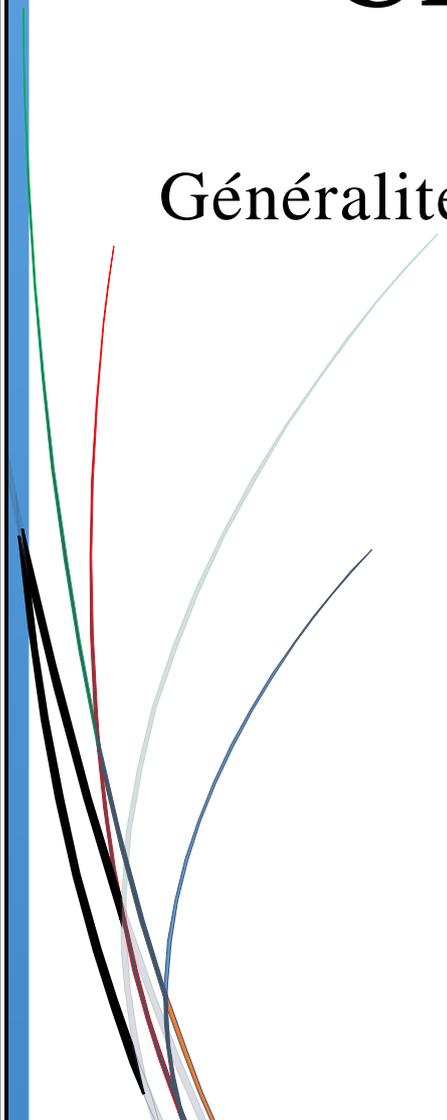
Les résultats obtenus, suivis de la discussion puis la conclusion et les perspectives feront l'objet de la troisième et quatrième partie, respectivement. Les références bibliographiques constitueront la dernière partie du manuscrit.



Synthèse bibliographique

CHAPITRE I

Généralités sur les huiles essentielles



I. Définition

1. Les huiles essentielles

Selon la 8ème édition de la Pharmacopée française de 1965, les huiles essentielles, nommées également « essences » ou « huiles volatiles », étaient « des produits de composition généralement assez complexe renfermant les principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation (ANSM, 1965).

Une huile essentielle est un liquide odoriférant d'aspect fluide à épais et de couleur variable selon les plantes dont elle est extraite. Elle est sécrétée par des cellules spécialisées se trouvant aussi bien dans les feuilles (menthe poivrée, basilic grand vert), les fleurs (lavande, ylang), le bois (cèdre Atlas, santal blanc), les racines (gingembre, valériane, vétiver), les graines (Coriandre, anis vert, carotte).

La taille de ces gouttelettes est de quelque micron, c'est pour Cela que nous ne les voyons pas. Mais lorsque que l'on froisse la plante aromatique, les Gouttelettes d'huile essentielle sont libérées dans l'atmosphère et parviennent jusqu'à notre Nez. Les récepteurs olfactifs du nez sont alors activés : ils envoient des stimuli sensoriels à différentes zones du cerveau.

II. Aromathérapie

L'aromathérapie est l'utilisation des huiles essentielles à des fins thérapeutiques, préventives ou curatives. Celles-ci sont utilisées soit par voie interne ou cutanée, soit par inhalation.

III. Chémotype ou chimiotype

La notion de Chémotype (chimiotype ou encore race chimique) est une notion clé en aromathérapie. Terme utilisé pour la première fois en 1968 par le Dr R. Santesson et son fils, le Chémotype est alors défini comme un « groupe chimiquement défini au sein d'une population d'individus morphologiquement indiscernables » (Keefover-Ring et al.,2009).

Le concept de Chémotype permet de distinguer deux ou plusieurs huiles essentielles de composition chimique différente produites à partir de plantes de la même espèce, définie par sa dénomination scientifique et non à partir de sa dénomination commune. Ainsi, la différence entre le thym à thymol et le thym à linalol (tous deux issus de *Thymus vulgaris*L.) n'est pas la même que celle entre la lavande fine et la lavande aspic (*Lavandula angustifolia* Mill. et *Lavandula latifolia* Medik).

Cela signifie que des individus de la même espèce botanique, ayant donc le même génome et le même phénotype, peuvent présenter des différences significatives au niveau de leur composition chimique. Celle-ci est en effet sous l'influence de nombreux facteurs.

IV. Localisation des huiles essentielles dans la plante

La synthèse des essences se fait au sein de différents tissus sécréteurs présents dans tous les organes de la plante : l'écorce, péricarpe des fruits, feuilles, pétales des fleurs, les graines, les racines ou encore les rhizomes d'où elles sont extraites par expression à froid ou par distillation. Elles peuvent être concentrées par déterpénation (Huet Raymond, 1991). Les huiles essentielles sont produites dans des cellules glandulaires spécialisées recouvertes d'une cuticule.

Elles sont alors stockées dans des cellules à l'huile essentielle, dans des poils sécréteurs, dans des poches sécrétrices ou dans des canaux sécréteurs. Elles peuvent aussi être transportées dans l'espace intracellulaire lorsque les poches à essences sont localisées dans les tissus internes sur le site de stockage, les gouttelettes d'huile sont entourées de membranes spéciales constituées d'ester, d'acide gras hydroxylé hautement polymérisé, associé à des groupements pyroxyle en raison de leur caractère lipophile et donc de leur perméabilité extrêmement réduite vis-à-vis des gaz. Ces membranes limitent fortement l'évaporation des huiles essentielles ainsi que leur oxydation à l'air (Brumeton, 1993 ; Anton et Lobstein, 2005).

V. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles

Les essences et les huiles essentielles ont des propriétés physiques communes, qui peuvent cependant varier en fonction de leur composition chimique (Pénoéld, 2001). Les huiles essentielles forment un groupe très homogène (Huet, 1991 ; Fernandez et Chemat, 2003). Les principales caractéristiques sont :

- Liquides à température ambiante ;
- N'ont pas le toucher gras et onctueux des huiles fixes ;
- Très rarement colorées ;
- Une densité faible pour les huiles essentielles à forte teneur en monoterpènes ;
- Un indice de réfraction variant essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés (Pénoéld, 2001 ; Fernandez et Chemat, 2012).
- Solubles dans les alcools à titre alcoométrique élevé et dans la plupart des solvants organiques mais peu solubles dans l'eau ;

- Très altérables, sensibles à l'oxydation et ont tendance à se polymériser donnant lieu à la formation de produits résineux, il convient alors de les conserver à l'abri de la lumière et de l'air.
- Elles sont volatiles, ce qui les différencie des huiles fixes (Bardeau ,1976 ; Legrand, 1978 ; Lamberg, 1982 ; Bruneton, 1995; Roux et Catier ,2007).Elles sont solubles dans: l'alcool, l'éther, le chloroforme, les huiles fixes, les émulsifiants et dans la pluparts des solvants organiques.
- Leur solubilité est totale dans les huiles grasses qui représentent leurs meilleurs solvants, elle est très grande dans les alcools à titres élevés et dans les solvants organiques (Pénoéld, 2001).

VI. Les composants chimiques des huiles essentielles

La composition chimique d'une HE est complexe, on y retrouve couramment plus d'une centaine de composés, parmi lesquels nombre de familles chimiques sont représentées (MOREL, 2008; Franchomme et al.,2009).

1. Les Terpènes

Comptant les monoterpènes, les sesquiterpènes et les di terpènes, exemple d'isoprène (exemple1, figure 1).

Ils ont généralement des effets thérapeutiques assez faibles, mails ils viennent nuancer ou compléter les actions des composants plus actifs. Ils présentent généralement une toxicité cutanée modérée : irritation, rougeur, chaleur.

2. Les Alcools

Les alcools ont généralement des propriétés antiseptiques, antivirales. Ils présentent généralement peu ou pas de toxicité (le menthol faisant exception a cette règle).

3. Les Phénols

Ce sont de puissants antibiotiques, à large spectre d'action, ainsi que de bons virucides et antifongiques. Les HÉs qui en contiennent en forte proportion doivent être utilisées avec parcimonie à cause de leurs toxicités. Un exemple est représenté dans la figure1 (exemple 2).

4. Les Phénols méthyle-éthers

Les phénols méthyl-éthers (estragole et anéthol) dérivent des phénols mais en ont perdu la dermocausticité (Exemple 3, figure 1). Ce sont des antispasmodiques des plus puissants, des antalgiques et des anti-inflammatoires majeurs.

5. Les Oxydes

Ils sont stimulants des glandes exocrines, antispasmodiques et antalgiques.
Exemple de l'apiol (figure 1).

6. Les Aldéhydes

Ils sont formés par l'oxydation des alcools, ce sont des molécules très volatiles qui dégagent souvent une odeur puissante (le citronellal est un bon répulsif). Plutôt négatives, elles ont des propriétés calmantes et anti-inflammatoires. Certaines sont antivirales.

Exemple du citronellal (figure 1, exemple5).

7. Les Esters

Ils sont négatifs, spasmolytiques, anticonvulsifs, anti-inflammatoires. Ils ne manifestent pas de toxicité aux doses thérapeutiques. Exemple du salicylate de méthyle (figure1).

8. Les Cétones

Ce sont des molécules très actives, dont les propriétés s'inversent en fonction de la dose employée : à faible dose elles sont stimulantes du système nerveux central, tachycardisantes, et à doses plus élevées elles sont calmantes voire entraînant un état de stupéfaction. A doses encore plus élevées, leur toxicité est redoutable. Exemple des thujones (figure1).

9. Les Lactones

Elles sont mucolytiques et expectorantes, et présentent des propriétés antibactériennes et parasitocides. Exemple de l' α -santonine (figure 1).

10. Les Coumarines

Ce sont de puissantes sédatives nerveuses, anticonvulsifs, elles sont hypotensives et anticoagulantes. Exemple du psoralène (figure 1).

11. Les Composés soufrés

Sont en général des anti-infectieux efficaces, mais ils sont fortement dermocaustiques, et leur emploi est délicat. Exemple de l'allylpropyl désulfite (figure 1).

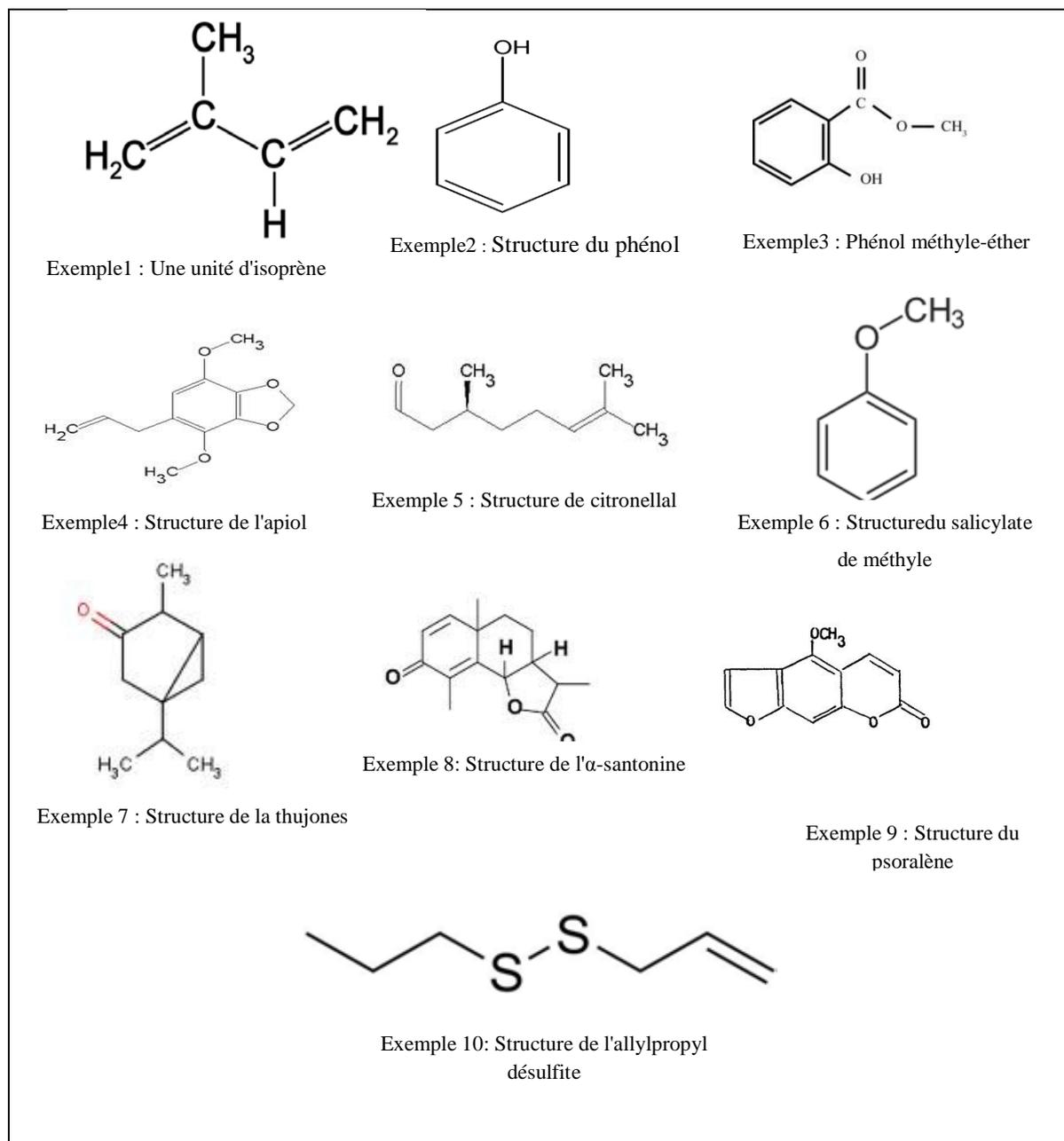


Figure 1 : Quelques exemples des composants des huiles essentielles. (MOREL, 2008; Franchomme et al., 2009).

VII. Facteur influençant la composition chimique des huiles essentielles

Il existe beaucoup de facteur externe pouvant influencer la composition chimique de l'HE : la température, le taux d'humidité, la durée d'ensoleillement, la composition chimique du sol, la partie de la plante utilisée, le cycle végétatif de la plante, la méthode utilisée pour l'extraction, sont d'autant de facteurs susceptibles d'exercer les modifications chimiques. Outre la composition, ces facteurs peuvent également avoir un impact sur la teneur en HE par exemple : les citrus ont une teneur importante en HE lorsque la température est élevée. Les

fleurs de *Chrysanthemum caronarum* sont riches en HE sous l'effet de fertilisants (Porter, 2001).

VIII. Méthodes d'extraction des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont produites par certains végétaux grâce à leurs organes sécréteurs localisés dans différentes parties de la plante (fleur, fruit, bois, racine, feuille...). Ces plantes, dites aromatiques, représentent seulement 10% de toutes les espèces végétales de la planète. En effet, la plupart des végétaux possèdent une odeur caractéristique mais ne font pas forcément partie des plantes aromatiques. Pour qu'un végétal appartienne à la famille des plantes aromatiques, il doit contenir une quantité plus ou moins importante d'essences dans une ou plusieurs parties de sa structure (Bonnafous et Miles, 2013).

Les plantes aromatiques sécrètent ces substances afin de se protéger contre les maladies, le froid, le dessèchement et certains prédateurs, comme les insectes nuisibles. Ainsi, la quantité d'essence fabriquée par la plante est directement proportionnelle à l'intensité de la rudesse climatique contre laquelle la plante doit faire face. Inévitablement, le taux d'essence obtenu à partir d'une plante qui pousse dans des conditions sauvages sera plus élevé que celui obtenu à partir d'une plante cultivée par l'homme. Cependant la culture des plantes aromatiques demeure indispensable pour la sauvegarde de la biodiversité naturelle. (Purchon, 2008 ;Festy, 2008).

Différentes méthodes d'extraction sont utilisées, le choix de la technique dépendra de la partie de la plante sélectionnée, du rendement souhaité, de la durée d'extraction, du coût... A titre d'exemple, la fleur de lavande contenant plus d'HE que la tige, la distillation de la fleur présentera un meilleur rendement que celle de la tige. Quel que soit la méthode utilisée, la composition moléculaire d'une HE doit rester identique au cours de l'extraction.(Worwood, 2002 ; Kaloustian et Hadji-Minaglou 2012).

Actuellement, trois procédés d'extraction sont reconnus : la distillation à la vapeur d'eau, l'expression mécanique, et l'extraction par solvant.

1. La distillation ou l'entraînement à la vapeur

L'entraînement à la vapeur constitue la technique la plus connue et la plus ancienne pour l'extraction des substances volatiles. En effet, des traces de son utilisation datant de l'antiquité ont été retrouvées. Avec le temps, les appareils d'extraction se sont perfectionnés, mais le principe de distillation reste inchangé. Toute huile essentielle étant insoluble dans l'eau, la distillation consiste donc à entraîner l'huile par de la vapeur d'eau. La majorité des huiles essentielles peuvent être extraites de cette façon, à la condition qu'elles ne soient pas

altérées par la chaleur, ce qui est le cas des fleurs de jasmin, trop délicates pour survivre à des températures élevées, l'HE de jasmin est donc obtenue à l'aide d'une méthode plus douce : l'enflourage. (Worwood, 2002 ; Bonneval et Dubus, 2014)

La distillation consiste à faire passer de la vapeur d'eau à travers une cuve contenant la plante aromatique. Cette méthode se caractérise ainsi par sa douceur et sa délicatesse car la plante ne se retrouve pas directement immergée dans l'eau bouillante. L'extraction doit s'effectuer sous basse pression afin d'éviter des phénomènes de suroxydation responsables d'une contamination des huiles essentielles par des goudrons cancérigènes. (Worwood 2002; Hoare, 2012; Kaloustian et Hadji-Minaglou, 2012).

Toutes les opérations d'extraction se réalisent dans un alambic, illustré dans la figure 2

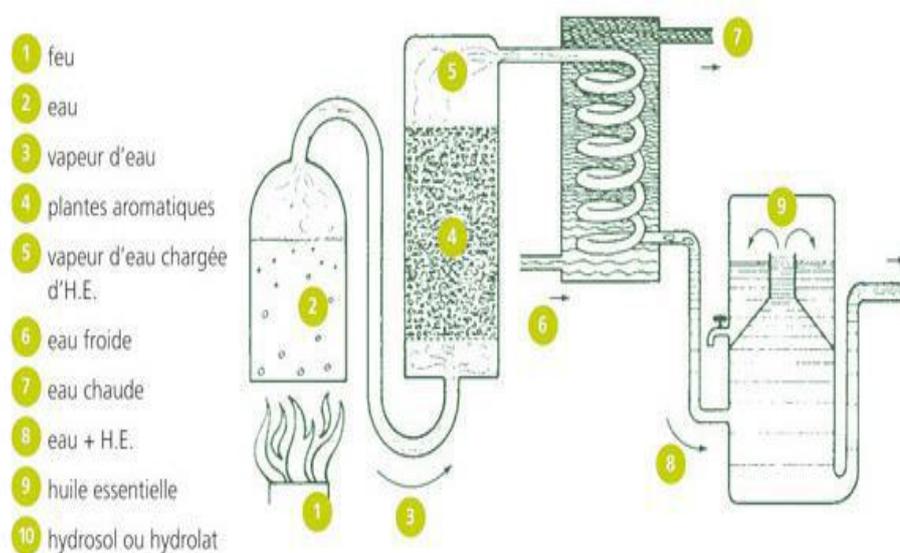


Figure 2 : procédé d'extraction d'une huile essentielle par entrainement à la vapeur d'eau (Roux-Sitruk, 2009).

La durée de l'extraction demeure variable et peut être longue : en moyenne, la distillation dure 30 minutes, mais si l'on souhaite extraire la totalité de l'HE contenue dans la plante, l'opération nécessite bien plus de temps.

2. Distillation sèche

Lors d'une distillation sèche, la plante n'est pas en contact direct avec l'eau. La masse végétale est disposée sur une plaque perforée et de la vapeur d'eau y est injectée au travers. Il est possible de travailler en surpression modérée (de 1 à 3 bars) afin de gagner en temps et en énergie mais la qualité de l'HE peut en souffrir (Bruneton, 2009). Cette méthode est utilisée pour les écorces, bois et racines.

3. Expression à froid

C'est le procédé le plus ancien et le plus simple pour obtenir une HE. Cependant, il reste limité car il ne s'applique qu'aux agrumes dont le péricarpe des fruits possède des poches sécrétrices d'essences. Cette technique, née en Sicile et en Calabre, est uniquement mécanique et consiste à broyer, à l'aide de presses, les zestes frais afin de détruire les poches sécrétrices d'essences et donc de libérer l'essence qu'elles contiennent. L'expression à froid permet de limiter l'oxydation en conservant les antioxydants naturels présents dans la fraction non volatile de l'essence. Le produit final obtenu est appelé essence car il n'a subi aucune modification chimique lors de son procédé d'extraction (Baudoux et al., 2012 ; Roux , 2011).

4. Extraction par les solvants

L'extraction par les solvants est un procédé inspiré de l'enfleurage qui utilise des solvants non aqueux. Il peut s'agir de l'hexane, d'éthers de pétrole, d'huiles, de gaz... Le solvant idéal doit être sélectif pour extraire les molécules aromatiques mais pas les molécules indésirables comme les pigments (Garneau, 2005).

Le point négatif des solvants organiques est leur toxicité. Cela réduit les champs d'application des extraits obtenus (appelés « concrètes »), notamment dans les domaines pharmaceutiques et agroalimentaires (Piochon, 2008).

❖ Autres méthodes d'obtention des huiles essentielles

D'autres méthodes ne sont autorisées par la pharmacopée européenne pour obtenir une HE de qualité pharmaceutique :

1. Percolation ou hydrodiffusion

La percolation est une méthode consistant à envoyer la vapeur d'eau de haut en bas et non de bas en haut comme pour la distillation. Cette méthode a l'avantage d'être plus rapide et donc moins préjudiciable à la qualité des substances aromatiques. Cependant, la percolation possède l'inconvénient de charger les HE en substances non volatiles. Il en résulte des « essences de percolation » et non des HE à proprement parler (Roux, 2011)

2. Extraction au CO₂ supercritique

Ce procédé, très moderne, consiste à faire éclater les poches à essences des végétaux et ainsi entraîner les substances aromatiques en faisant passer un courant de CO₂ à haute pression dans la masse végétale (en générale les fleurs). On utilise le CO₂ car il possède de nombreux atouts : il s'agit d'un produit naturel, inerte chimiquement, ininflammable, facile à éliminer totalement, aisément disponible, peu réactif chimiquement et enfin peu coûteux. Le CO₂ a également la capacité de fournir des extraits de compositions très proches de celles obtenues par les méthodes décrites dans la pharmacopée européenne. Tous ces avantages

permettent à ce procédé de se développer malgré un investissement financier important (Keville et Green, 1995 ;Baysal et Starmans , 1999).

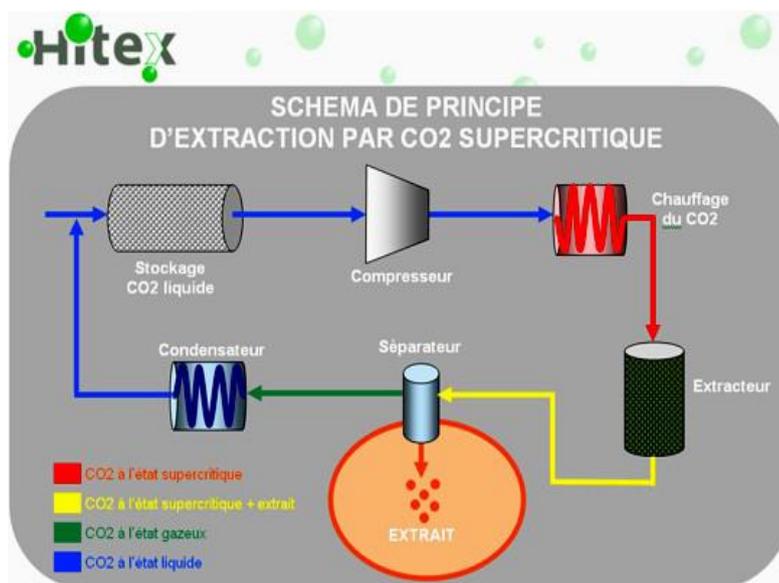


Figure 3: L'extraction au CO2 supercritique

3. Enfleurage

L'enfleurage est une technique ancienne mettant en contact l'organe producteur (généralement la fleur) avec une graisse qui se sature en HE après quelques jours. On obtient alors des pommades qui sont utilisées telles quelles ou extraites par de l'éthanol. Les extraits alcooliques aux fleurs ainsi obtenus sont appelés « absolues » (Lardry et Haberkorn , 2007).

4. Hydrodistillation

Maintenant, des méthodes d'hydrodistillation améliorées sont inventées, on peut citer :

4.1.Hydrodistillation sous pression

Bien que ce procédé conduise à une amélioration du rapport d'entraînement, donc, à des économies d'énergie, l'influence d'une température élevée (supérieure à 100°C) sur la qualité de l'huile essentielle donne lieu à certains artéfacts.

4.2.Le système de thermopompage

Consiste à pomper la chaleur du condenseur et à l'utiliser pour la production de vapeur. Les économies d'énergie calorifique et d'eau de refroidissement se situeraient entre 60 et 90%.

4.3.Turbodistillation

Pour activer la distillation à la pression atmosphérique, l'alambic est équipé d'une turbine qui permet d'une part, la dilacération des matières végétales, d'autre part une agitation

turbulente, d'où un meilleur coefficient de transfert thermique et une augmentation de la surface de vaporisation (Cu et al.,1999).

4.4.Hydrodistillation par micro-ondes

Méthode très rapide (temps de travail divisé par 5 à 10 par rapport à l'hydrodistillation traditionnelle), peu consommatrice d'énergie (température plus basse) et de qualité supérieure à l'hydrodistillation traditionnelle. Elle consiste à chauffer sélectivement une plante par un rayonnement micro-ondes dans une enceinte où la pression est diminuée de façon séquentielle : l'HE est alors entraîné dans un mélange azéotrope formé par la vapeur d'eau de la plante traité (sans ajout d'eau pour les produits traités en frais) (Skaria et al., 2007).

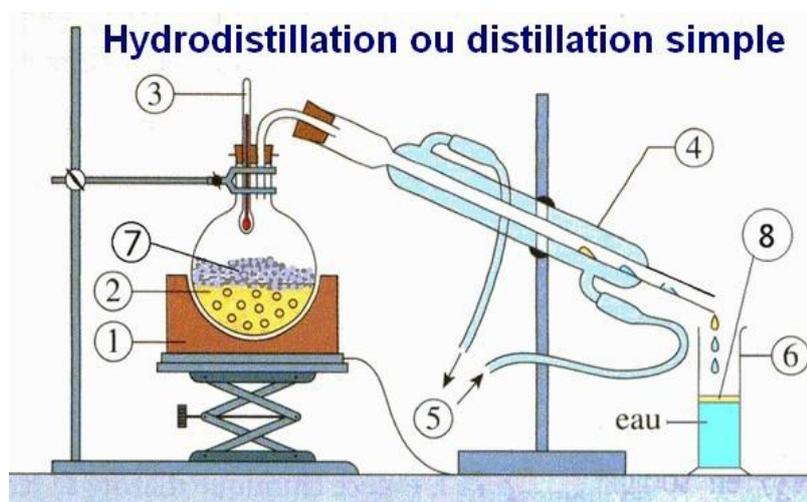


Figure 4 : L'hydrodistillation

1 :Chauffe-ballon 2:Eau bouillante 3:Thermomètre 4:Réfrigérant a eau 5:Arrivée d'eau froide et Sortie d'eau tiédie6:Essencier 7:Végétal 8:Huile Essentielle

X. Procédure par épuisement

Les HE peuvent être extraites par des solvants volatils, type benzène. A partir des concrètes de feuilles et de fleurs obtenues, des « absolues » sont obtenues après extraction par de l'éthanol. L'évaporation de l'éthanol conduit aux « essences concrètes ». Ces dernières contiennent généralement 2 à 3% de solvants résiduels et ne peuvent être utilisées que pour l'aromachologie (Velé , 2015).

XI. Méthodes d'analyse des huiles essentielles

Selon la Pharmacopée Française et Européenne, le contrôle des huiles essentielles s'effectue par différents essais, comme la miscibilité à l'éthanol et certaines mesures

physiques : indice de réfraction, pouvoir rotatoire et densité relative. La couleur et l'odeur sont aussi des paramètres importants (Pibiri, 2006).

La meilleure carte d'identité quantitative et qualitative d'une huile essentielle reste cependant le profil chromatographique en phase gazeuse. Il permet de connaître très exactement la composition chimique.

1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La CPG s'est montrée une méthode appropriée pour la séparation et l'identification des composants d'une HE, elle réalise à la fois une analyse qualitative et quantitative (Paris et Godon, 1979).

L'échantillon est vaporisé et injecté en tête de colonne. L'élution est assurée par un flux de gaz inerte qui sert de phase mobile. La CPG est basée sur le partage de produit analysé entre une phase gazeuse mobile et une phase (liquide ou solide) immobilisée sur la surface d'un support inerte (Skoog et al., 2003).

Les constituants des mélanges appelés généralement « solutés » sont inégalement retenus par la phase stationnaire lors du transit dans la colonne. De ce phénomène appelé « rétention », les solutés injectés se déplacent avec une vitesse inégale entre eux et inférieure à celle de la phase mobile, ceci les conduit à sortir de la colonne les uns après les autres. On enregistre d'abord un signal dit ligne de base en présence du gaz vecteur seul, puis un pic au passage de chaque soluté séparé (Tranchant, 1995).

XII. Conservation des huiles essentielles

Les huiles essentielles de bonne qualité peuvent se conserver plusieurs années sous certaines conditions.

Les huiles essentielles sont volatiles, il ne faut donc pas oublier de bien fermer les flacons.

Il est préférable de les conserver dans un flacon en aluminium ou en verre teinté (brun, vert, ou bleu) et de les garder à l'abri de la lumière à une température ambiante jusqu'à 20°C (Agkerman et al., 1996).

Il existe des normes spécifiques sur l'emballage, le conditionnement et le stockage des huiles essentielles ainsi que sur le marquage des récipients contenant des HE (Pénoéld, 2001).

XIII. Activité biologique des huiles essentielles

Les huiles essentielles possèdent de nombreuses activités biologiques :

1. L'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne d'une huile essentielle spécifique est principalement déterminée par sa concentration et sa composition chimique. La plupart des composants qui présentent une efficacité antimicrobienne élevée sont les phénols, suivis des terpénoides

oxygénés, les terpènes et autres constituants des huiles essentielles, notamment les cétones et les esters, tels que le β -myrcène, l' α thujone et l'acétate de géranyl, présentent une activité antimicrobienne beaucoup plus faible que les phénols et les terpénoïdes (Jiajia Rao et al.,2019).

2. Activité insecticide

L'activité insecticide des plantes aromatiques s'exerce à deux niveaux : un effet léthal sur les populations adultes et une inhibition de la reproduction. L'activité protectrice des plantes aromatiques résulte de l'action de plusieurs composés allélochimiques, notamment terpéniques et polyphénoliques, que les plantes synthétisent au cours du métabolisme secondaire. L'utilisation de ces molécules dans le cadre de la lutte écochimique pourrait contribuer à diversifier les méthodes de lutte contre les insectes phytoravageurs(Regnault-Roger et Hamraoui 2013).

3. Activité antioxydantes

Les huiles essentielles (HE) représentent une source de molécules bioactives et font l'objet de nombreuses études pour leur éventuelle utilisation comme alternative pour la protection des aliments contre l'oxydation (Barkat et Imène ,2011).

Le recours à ces huiles s'avère être un choix pertinent comme agents de conservation à la place des conservateurs synthétiques. Le rôle de ces essences comme antioxydants naturels suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer, des maladies inflammatoires et cardiovasculaires ; elles sont également utilisées comme additifs en industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique (Houbairi et al.,2015).

4. Activités anthelminthiques

Certaines huiles essentielles sont reconnues pour leur action sur les vers intestinaux. Un des constituants ayant montré une activité anthelminthique est l'ascaridole qui reste le principal constituant actif de l'essence de *Chenopodium ambrosioides* et du thymol (Satrija et al.,1995).

5. Activité sur les affections respiratoires etantiseptique

Certaines huiles essentielles sont dotées d'un pouvoir antiseptique marqué. Ce dernier s'exerce sur des souches bactériennes variées, y compris celles habituellement résistantes en antibiotique (Tétracycline, acide oxolinique) (Burt, 2004). En effet, elles sont « eu-biotiques » (Ngassapa et al., (2003). C'est à dire qu'elles détruisent les parasites sans interférence avec l'organisme hôte, contrairement aux antibiotiques qui très souvent interagissent avec les parasites en les dénaturant avec des effets secondaires sur les sujets traités. Elles agissent généralement à faible dose (Bruneton, 1995). Certaines huiles essentielles sont utilisées dans

le traitement de certaines maladies du tractus respiratoires : toux, bronchites, angines... (Milijaona et al., 2003).

XIV. Mécanismes d'action des huiles essentielles

1. Cytotoxicité

Les huiles essentielles ou certains de leurs constituants sont en effet efficaces contre une grande variété d'organismes tels que les bactéries, les virus, les champignons, les protozoaires, les parasites, les acariens, les larves, les vers, les insectes et les mollusques (Lahlou et Berrada, 2001).

En raison du nombre important des constituants qu'elles contiennent, les huiles essentielles n'ont pas de cibles cellulaires spécifiques (Carson et al., 2002). En tant que lipophiles, elles passent à travers la paroi cellulaire et la membrane cytoplasmique, ce qui perturbe la structure des différentes couches polysaccharidiques, des couches phospholipidiques, des acides gras et rend ainsi la membrane perméable.

Les huiles essentielles peuvent coaguler le cytoplasme (Gustafson et al., 1998) et induire des dommages lipidiques et protéiniques (Burt, 2004). Ces altérations de la paroi cellulaire et de la membrane entraînent la fuite des macromolécules et la lyse cellulaire (Cox et al., 2000 ; Lambert et al., 2001; Oussalah et al., 2006).

Les huiles modifient ainsi la fluidité des membranes, qui deviennent anormalement perméables, entraînant une fuite de radicaux, et de cytochrome C ; la fuite des ions calcium et des protéines peut avoir lieu, comme dans le cas du stress oxydatif et l'échec bioénergétiques (Yoone et al., 2000 ; Armstrong, 2006).

2. Phototoxicité

Dans le cas de la phototoxicité, les huiles essentielles pénètrent dans la cellule, sans pour autant endommager les membranes ou les protéines et l'ADN. Des réactions radicales par excitation de certaines molécules et le transfert d'énergie par la production de mono oxygène se produisent lorsque les cellules sont exposées à la lumière. Ceci peut causer des dommages macromoléculaires au niveau des cellules et dans certains cas la formation d'adduits (adducts) covalente à l'ADN, protéines et lipides membranaires (Davis, 2006).

De toute évidence, la phototoxicité ou la Cytotoxicité dépendent des types de molécules présents dans les huiles essentielles et de leur compartimentation dans la cellule, la production de différents types de radicaux, avec ou sans exposition à la lumière.

XV. Précautions d'emploi

Les huiles essentielles doivent être prises à bon escient et à doses adaptées afin d'éviter de dommageables effets secondaires.

- Il ne faut jamais injecter d'huiles essentielles par voie intramusculaire ou veineuse.
- Certaines huiles essentielles pures sont agressives pour la peau, comme l'huile essentielle de thym vulgaire. Il faudra donc les diluer dans une huile végétale (amande douce, olive...).
- Il faut se laver les mains après toute application cutanée.
- Il ne faut jamais appliquer d'huile essentielle pure sur les yeux, le nez, le conduit auditif, les muqueuses ano-génitales.
- Il ne faut pas mettre sur la peau des huiles essentielles avant toute exposition au soleil.
- Il est interdit de faire des aérosols d'huiles essentielles aux patients allergiques et asthmatiques sans contrôle médical,
- Il faut faire attention aux interactions avec les traitements des patients. Les huiles essentielles peuvent interagir avec un médicament. Par exemple, l'huile essentielle d'ail stimule la thyroïde alors que celle de fenouil diminue son activité.
- Il faut éviter d'utiliser l'huile essentielle de *Mentha piperata* sur une zone trop étendue du corps car elle peut provoquer des convulsions, un effet vasoconstricteur et anesthésiant. Elle est fortement contre-indiquée chez la femme enceinte, et chez le nourrisson jusqu'aux enfants âgés de moins de sept ans.
- Il faut éviter de laisser les flacons à la portée des enfants (Davis, 2006 ; Baudoux, 2007).

XVI. Intérêts et rôles des huiles essentielles

Depuis le Moyen Âge, les huiles essentielles sont largement utilisées pour des applications bactéricides, virucides, fongicides, antiparasitaires, insecticides, médicinales et cosmétiques, en particulier dans les industries pharmaceutique, sanitaire, cosmétique, agricole et alimentaire (Bakkali, 2007).

Les huiles essentielles sont extraites des plantes aromatiques et essentielles, elles sont réputées pour leurs propriétés thérapeutiques (tel que les terpènes), en particulier anti-infectieuses, souvent sous forme de produits non médicamenteux. Comme ce sont des composés volatils, elles jouent également un important rôle dans la défense des plantes et des forêts contre les agressions naturelles, mais aussi pour lutter contre la sécheresse en contribuant à la pluviosité (Soualech et Soulimani, 2016) et ce pouvoir n'est pas seulement réservé aux plantes, mais également pour tout être sur cette terre. Elles vont donc nous

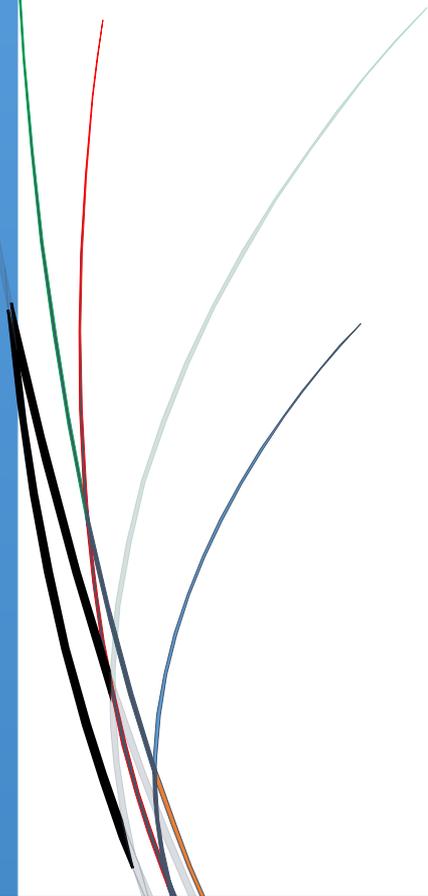
permettre de nous aider à soutenir et stimuler notre organisme de manière naturelle, sans les inconvénients des substances chimiques : pas d'effets secondaires (si elles sont utilisées correctement) ni d'accoutumance. Elle s'adapte aux besoins de l'organisme sans remplacer ses fonctions.

Sont également reformulées par l'industrie alimentaire pour remplacer les additifs alimentaires artificiels, tels que les colorants, les arômes et les agents de conservation, par des alternatives plus naturelles.

Ainsi, elles sont utilisées dans l'agroalimentaire (gâteaux, biscuits, soupe, sauce, chewingum, chocolats, bonbons...) pour aromatiser la nourriture. Elles sont également utilisées dans l'industrie de la parfumerie, de la cosmétique et de la savonnerie. On les utilise aussi dans la fabrication des adhésifs (colle, scotch ...), et celle de la nourriture pour animaux, dans l'industrie automobile, dans la préparation des sprays insecticides (Bakkali, 2007).

CHAPITRE II

Généralités sur les plantes étudiées



I. *Lavandula angustifolia* Mill

1. Description

La Lavande officinale, Lavande vraie ou Lavande à feuilles étroites est une espèce de sous-arbrisseaux de la famille des Lamiaceae. C'est une plante qui est appréciée pour son odeur. C'est la plus appréciée des lavandes pour la qualité olfactive de son huile essentielle. La Lavande vraie se distingue par ses feuilles étroites et ses faux épis bleu-violet. Son odeur fine et pénétrante. Spontanée dans le Sud-Est de la France, elle y est cultivée depuis plusieurs siècles et sa distillation est une tradition déjà ancienne.

Originaires des montagnes provençales : France, Bulgarie, Moldavie ou Russie, la Lavande Fine pousse à l'état sauvage entre 800 et 1800 mètres d'altitude.



Figure 5 : plante de lavande fine

2. Historique

Les Romains profitaient déjà des qualités aromatiques de la lavande aux thermes et ils en parfumaient leurs vêtements et leurs bains. Son nom est d'ailleurs dérivé de *lavare*, un mot latin qui signifie « laver ». Le mot « lavandière » vient du fait qu'on ajoutait de la lavande à l'eau de lessive afin de parfumer les vêtements. Au Moyen Âge, ses pouvoirs désinfectants étaient reconnus et on en faisait des fumigations et des emplâtres destinés à combattre la peste.

Pendant de nombreuses années, son huile essentielle fut également employée pour désinfecter l'air de certains hôpitaux. Aujourd'hui, l'huile essentielle de Lavande Fine est considérée comme l'une des bases de l'aromathérapie.

3. Description botanique

La Lavande officinale ou Lavande fine est la plus prisée. Originaires des basses montagnes du bassin méditerranéen, elle pousse en altitude au-dessus de 1 000 m sur des coteaux arides, calcaires et ensoleillés. C'est une plante vivace et broussailleuse. Ses feuilles sont étroites, linéaires et ses fleurs bleu-violet apparaissent en épis associés à deux petites bractées ovales et pointues. Son excellente tolérance cutanée, sa parfaite innocuité, son

efficacité prouvée lui attribuent une place de choix dans toutes les pharmacies familiales naturelles.

Il existe plusieurs espèces botaniques de lavandes et elles ne possèdent pas toutes les mêmes vertus (La lavande officinale, La lavande stoechade, La lavande aspic, Le lavandin)

4. Classification

La Lavande fine est une espèce d'arbre de la famille des *Lamiaceae*.

- **Domaine** : Biota
- **Règne** : Plantae
- **Sous-Règne** : Viridaeplantae
- **Infra-Règne** : Streptophyta
- **Classe** : Equisetopsida
- **Clade** : Tracheophyta
- **Clade** : Spermatophyta
- **Sous-Classe** : Magnoliidae
- **Ordre** : Lamiales
- **Famille** : Lamiaceae
- **Sous-Famille** : Nepetoideae
- **Tribu** : Ocimeae
- **Genre** : *Lavandula*
- **Espèce** : *Lavandula angustifolia* Mill.
- **Sous-Espèce** : *Lavandula angustifolia* subsp.

5. L'huile essentielle de la lavande fine

L'huile essentielle de Lavande officinale, est sans conteste une huile essentielle incontournable de l'aromathérapie. Obtenue à partir des sommités fleuries de la lavande par distillation complète, elle est particulièrement appréciée pour son parfum délicat, ainsi que ses vertus apaisantes et régénérantes. Au vu du nombre d'articles scientifiques existants, l'huile essentielle de Lavande officinale est très probablement l'huile essentielle la plus étudiée aujourd'hui, ce qui permet de justifier sans grande difficulté de son grand intérêt pour soulager les problèmes de peau, les troubles nerveux, ainsi que les douleurs chez les petits comme chez les grands.

6. Propriétés des huiles essentielles

L'huile essentielle de lavande fine est reconnue pour ces propriétés :

- Anti inflammatoire, antalgique et anesthésique
- Propriétés antispasmodiques
- Propriétés relaxantes, et anxiolytiques
- Propriétés à visée cutanée : cicatrisante, anti inflammatoire, et antiride

- Poux : action préventive et curative
- Cardiovasculaires

7. Composition

- Esters terpéniques : acétate de linalyle (**25-45%**), acétate de lavandulyl
- Monoterpénols : linalol (**20 à 40%**), a-terpinéol, terpinène-4-ol
- Autres composants en faibles quantités : limonène, 1,8 cinéole, camphre octanone, β -caryophyllène.

II. *Pinus sylvestris* L

1. Description

Le Pin Sylvestre est un arbre résineux appartenant à la famille des Pinacées (*Pinus sylvestris*), porte plusieurs noms, comme « pin d'Auvergne », « pin de Genève », « pin rouge » ou encore « pin d'Écosse ».

Naturellement présent dans une grande partie de l'Europe tempérée et de la Sibérie, il est aussi appelé Pin du Nord ou Pin Riga. C'est l'espèce ligneuse dont l'aire de diffusion naturelle est la plus étendue. Ce conifère peut atteindre 40 mètres de hauteur et vivre jusqu'à 500 ans. Son écorce de couleur ocre orangé-rouge est caractéristique, ce qui permet de le reconnaître parmi toutes les espèces de pin.



Figure 6 : plante de Pin sylvestre

2. Historique

Pinus est un nom d'origine grecque se référant à pítus, píttá « pin, résine » ou pix « poix résine ». Sylvestre, est un prénom d'origine latine dérivé de Silva (signifiant la forêt).

En 1534, l'explorateur « Jacques Cartier apprit des Indiens la valeur antiscorbutique des extraits d'aiguilles de pin » (Jean-Pierre Willem). Le père de la médecine grecque, Hippocrate, le citait pour ses bénéfices sur l'appareil respiratoire. Sous le règne de Louis-Philippe, le pin sylvestre fut planté abondamment sur les landes et les zones rocheuses de la forêt de Fontainebleau.

Aujourd'hui, son aire de répartition naturelle est extrêmement large : on le trouve du sud de la péninsule ibérique à la Turquie, des montagnes écossaises à la Mandchourie en

passant par l'extrême Nord sibérien. Il est couramment utilisé dans la construction et dans la fabrication de pâte à papier, son bois étant exploité pour produire du déroulage de contreplaqué et dans la charpente. On en tire aussi de l'essence térébenthine et évidemment de l'huile essentielle de pin sylvestre.

3. Description botanique

Membre de la famille des Pinacées, comme le Sapin et l'Épicéa, le pin sylvestre est originaire d'Asie. Il est aujourd'hui très répandu dans les zones froides et montagneuses d'Europe. Faisant partie des végétaux connus comme les plus anciens du monde, il apprécie particulièrement les sols sablonneux et rocailleux. Il peut atteindre une hauteur de 40 mètres. Ses feuilles en forme d'aiguille poussent par paire. Il présente un cône ovale de 7,5 centimètres de long vert puis brun lorsqu'il arrive à maturité. Dès la fin du printemps, des cônes bourgeonnent et leur couleur diffère selon qu'il s'agit de cônes mâles (jaunes) ou femelles (rouges).

L'écorce de cette espèce, grise chez les jeunes sujets, se colore progressivement avec l'âge en brun orangé. Tandis que l'écorce de son houppier s'affine et se détache en minces plaques, celle de la partie basse du tronc laisse apparaître de profonds sillons. Ses aiguilles, géminées et vrillées, mesurent 4 à 8 centimètres de longueur. De couleur gris vert ou gris bleuté, elles sont souples, pointues, mais non piquantes.

4. L'huile essentielle de pin sylvestre

L'huile essentielle de pin sylvestre se caractérise par une forte odeur balsamique, et épicée rappelant la note térébenthine. Obtenu par distillation à la vapeur d'eau. Cette huile essentielle est irritante pure sur la peau. Il est indispensable de la diluer dans une huile végétale.

Elle ne doit pas être utilisée seule dans un diffuseur électrique à jet d'air sec. Il est recommandé de lui associer une huile essentielle ou une essence de citronnier ou une huile essentielle ou une essence de pamplemoussier.

5. Propriétés

Les propriétés de l'huile essentielle de Pin sylvestre s'expliquent par la présence de composés actifs à l'origine présents dans les aiguilles et pommes de pin de *Pinus sylvestris* :

- Hypertensive
- "cortison-like" : effet similaire à la cortisone, tonique et stimulante
- Antiseptique respiratoire et expectorante et percutané

- Rubéfiante, elle réchauffe, analgésique cutanée
- Antibactérienne moyenne
- Décongestionnante lymphatique
- Anti-infectieuse (Bactéricide, antivirale, antifongique)
- Antalgique
- Anti-inflammatoire
- Drainante (anti-œdémateuse)

6. Constituants responsables des principales propriétés

- Alpha-pinène : 38 à 60 %
- Béta-pinène : 20 à 25 %
- Limonène : 4 à 12 %
- Béta-caryophyllée : 2 à 3 %

7. Composition

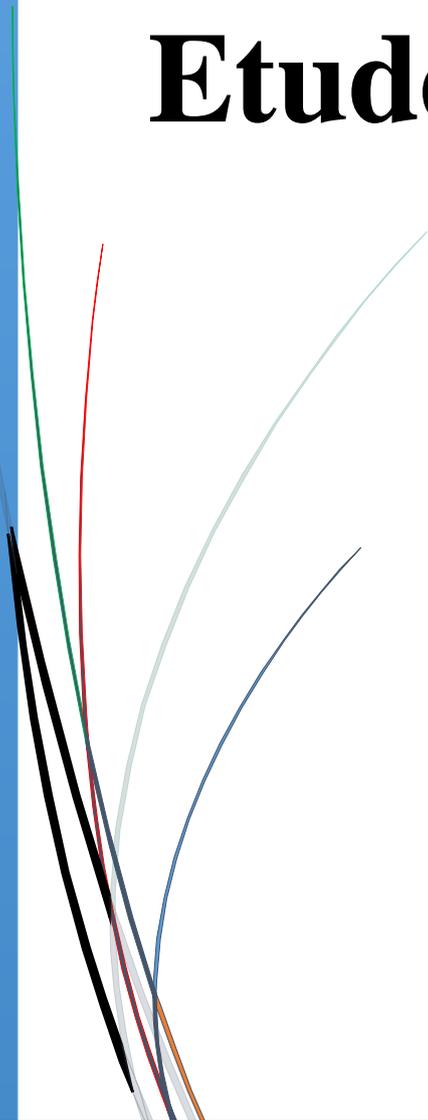
Dans sa biochimie aromatique entrent le tanin, la résine, l'acide primaire, l'acide primarinique, le pinipicrine, 40 % et 13 % de terpènes, Alpha-Pinène et bêta-pinène, 25 à 30 % de limonène et de l'acétate de bornyle.

8. Classification

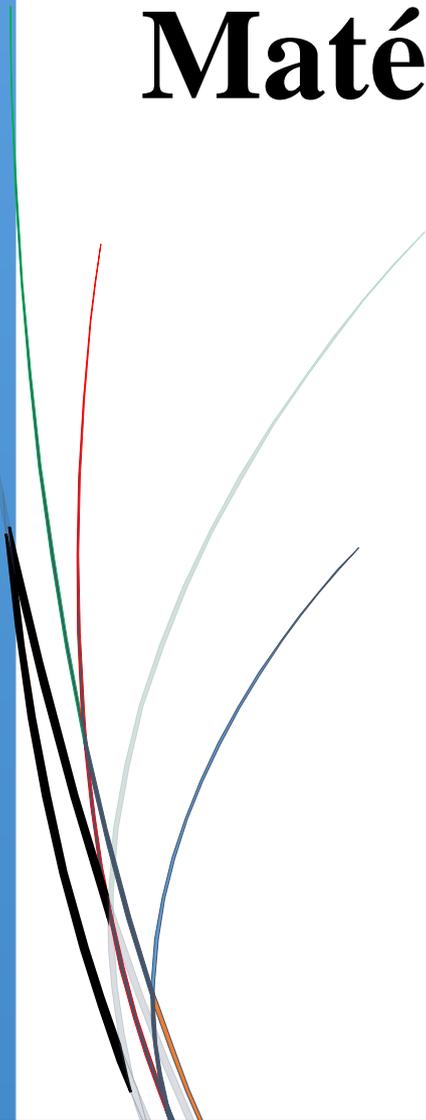
Le Pin sylvestre est une espèce d'arbre de la famille des *Pinaceae* .

Domaine : Biota
Règne : Plantae
Sous-Règne : Viridaeplantae
Infra-Règne : Streptophyta
Classe : Equisetopsida
Clade : Tracheophyta
Clade : Spermatophyta
Clade : Gymnosperma
Sous-Classe : Pinidae
Ordre : Pinales
Famille : Pinaceae
Genre : *Pinus* L.
Espèce : *Pinus sylvestris* L.

Etude expérimentale



Matériel et méthodes



Dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales et aromatiques, nous nous sommes intéressées sur l'un de leurs métabolites secondaires que sont les huiles essentielles de deux plantes d'usage assez répandu; *Lavandula angustifolia* Mill et *Pinus sylvestre* L.

Afin d'étudier leur activité antibactérienne ainsi leur potentiel synergique vis-à-vis des souches pathogènes, notre expérimentation s'est déroulée au sein du laboratoire pédagogique de microbiologie de l'UMMTO, pour une durée de trois mois allant de 12 avril 2019 au 12 juillet 2019.

I. Matériel

1. Matériel microbiologique

Notre étude a porté sur huit souches bactériennes pathogènes référenciées, qui font partie de la collection des souches bactériennes du laboratoire de Microbiologie de l'université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou. Leurs caractéristiques sont représentées dans le tableau ci-dessous :

Tableau I : Caractéristiques des souches bactériennes utilisées

Les souches bactériennes	Caractéristiques
<i>Enterococcus faecalis</i> WDCM 00009	Coccobacille- Gram positif
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Cocci -Gram positif
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	Bacille-Gram positif
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 10541	Coccobacille- Gram positif
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Bacille-Gram négatif
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Bacille- Gram négatif
<i>Klebsiella Pneumoniae</i> ATCC 700603	Forme de tige-Gram négatif-encapsulé
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	Bacille-Entérobactérie-Gram négatif

2. Les huiles essentielles testées

Deux huiles essentielles naturelles, aromatiques et 100% pures ont été utilisées pour l'évaluation antibactérienne qui sont : *Lavandula angustifolia* Mill et *Pinus sylvestris* L représentées dans le tableau IV :

Tableau II : Description des huiles essentielles testées

Huile essentielle	Nom latin	Molécule active	Organe	Méthode d'extraction
Lavande fine	<i>Lavandula angustifolia</i> Mill	Acétate de linalyle, linalol, cis- β -ocimène	Sommités fleuries	Distillation
Pin sylvestre	<i>Pinus sylvestris</i> L	α -pinène, β -pinène	Aiguilles	Distillation à la vapeur d'eau

3. **Les antibiotiques utilisés** l'ensemble des antibiotiques utilisés sont cités dans le tableau suivant :

Tableau III : Les antibiotiques utilisés

Nom	Abréviations
Amoxiline	AM
Colistine	CS
Cefotaxime	CTX, CTX30
Gentamicine	GN, CN, CN10
Oxytétracycline	O, O30
Kanamycine	K, K30
Peniciline	P
Peniciline G	P10
Vancomycine	VA
Amoxicillin	AML30, AX25
Cefoxitin	FOX30
Neomycin	N30
Vancomycin	VA30
Piperacilline	PIP
Pefloxacin	PEF
Piperacilline Tazobactam	PZP
Cefazoline	CZ
Fosfomycine	FOS

4. Les milieux de culture

L'ensemble des milieux de culture utilisés durant l'étude sont fournis par le laboratoire pédagogique de microbiologie et qui sont représentés dans le tableau VI

Tableau IV : Milieux de culture

Milieux de culture	utilisations
Gélose Muller Hinton (MH)	Etude de l'activité antibactérienne
Gélose nutritive (GN)	Repiquage des souches
Brain Heart Infusion Broth (BHIB)	Enrichissement des souches bactériennes

5. L'Emulsifiant

C'est le diméthylsulfoxyde (DMSO) qui est un solvant polaire organosulfuré et aprotique, ajouté pour diluer les huiles essentielles testées afin d'avoir une meilleure diffusion dans le milieu et comme témoin négatif pour comparer l'activité des HEs.

6. Appareillage

La réalisation de ce travail a nécessité l'utilisation des appareils suivants :

- ❖ Autoclave (WEBECO. Allemagne)
- ❖ Bain marie (MEMMERT. Allemagne)

- ❖ Balance (KERN770.Allemagne).
- ❖ Etuve bactériologique à 37°C (BINDER. Allemagne)
- ❖ Agitateur a barreau magnétique chauffant (GARHARDT. Allemagne)
- ❖ Spectrophotomètre (Vis-7220G.Biotech Engineering. Management CO.LTD (UK))
- ❖ Réfrigérateur (ENIEM.ALGERIE)
- ❖ Vortex (HEIDOLPH. Germany)

I. Méthodes

1. Revérification et confirmation de la pureté des souches

Afin de vérifier la pureté des souches, la méthode de coloration de Gram a été effectuée :

1.1 Principe de la méthode

La paroi bactérienne peut être plus ou moins perméable au passage de certains solvants Cette propriété est mise à profit au court de la coloration Gram.

Cette dernière, consiste à traiter un frotti ou un étalement bactérien séché, fixé à la chaleur par une solution de violet de Gentiane, puis par une solution iodo-iodurée (Lugol).

En soumettant la préparation à l'action de l'éthanol, les cellules bactériennes réagissent de deux façons et forment deux groupes :

Les unes dites « Gram négatif » se décolorent rapidement sous l'action du solvant ; les autres, au contraire, conservent leurs coloration violettes et sont dites « Gram positif ».

Pour accentuer le contraste, la préparation est finalement traitée par la fushine ou de la safranine : les bactéries à Gram négatif se colorent en rose, tandis que les bactéries à Gram positif restent violettes (Meyer et al.,).

2. Repiquage des souches

L'ensemble des souches bactériennes sont entretenues par repiquage sur milieu nutritif gélosé favorable à leur croissance pendant 24 h à l'obscurité à 37 °C afin d'obtenir des colonies jeunes et bien isolées pour l'étude de l'activité antimicrobienne.

Le repiquage se réalise 24h avant chaque nouvelle série de tests.

Afin de conserver les souches à court terme des colonies ont été ensemencées dans des tubes contenant 3mL du milieu incliné (gélose de conservation) et incubé à 4°C.

3. Préparation et standardisation de la suspension bactérienne

Une suspension bactérienne correspondant aux normes de MC Ferland a été préparée à partir d'une culture pure et jeune (âgée de 18 à 24h).

Ces normes équivalentes à une densité optique(DO) de 0.08 à 0.1 à 620 nm. Dans le but d'obtenir une concentration de 10^6 UFC/ml.

Cet inoculum sert à ensemercer des géloses de MH coulées dans des boîtes de Pétri par un écouvillon imbibé de la suspension par la méthode de stries serrés.

4. Etude de l'activité antimicrobienne des deux huiles essentielles

Pour surmonter le problème de résistance des microorganismes vis-à-vis des antibiotiques, la plupart des travaux sont orientés actuellement vers d'autres agents antimicrobiens possédant un mode d'action tout à fait spécifique (Labiod, 2016).

L'activité antimicrobienne des deux HE a été déterminée par deux méthodes différentes :

- ✓ La méthode de diffusion de disque en milieu gélosé (aromatogramme) cité par (Sacchetti et al.,2005 ; Celiktas *et al.*, 2007).
- ✓ La méthode de microdilution en milieu liquide pour déterminer les CMI (NCCLS 2000).

4.1. Aromatogramme

Pour chaque souche testée des disques de papier Whatman de 6mm de diamètre stériles imprégnés de 10 μ l de chaque huile diluée dans le DMSO (95% de L'huile+5% de DMSO V /V) ont été déposés sur la surface de la boîte de pétri contenant des géloses MHensemencées avec les suspensions bactériennes standardisées à étudier.

D'autres disques chargés de 10 μ l de DMSO stérile ont été déposés pour servir de témoin négatif, et également un antibiogramme pour servir de témoin positif (tester la sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques supposés).

Chaque huile et antibiotique diffusent à partir du disque au sein de la gélose et y déterminent une zone d'inhibition en fonction de la concentration de l'antibiotique ou de l'huile.

Les bactéries croissent sur toute la surface de la gélose sauf là où elles rencontrent une concentration d'huile ou d'antibiotique suffisante pour inhiber leur croissance. Ainsi on observe des zones circulaires indemnes de colonies au tour des disques appelées, zone d'inhibition.

Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible à l'huile ou à l'antibiotique. Plus il est petit, plus la bactérie est résistante (Fauchere et Avril, 2002).

Ensuite, Les boîtes gélosées sont maintenues à la température du réfrigérateur (4°C) pendant 1 heure afin de permettre la pré-diffusion.

Enfin, incubées à 37°C pendant 24h pour la lecture. Deux essais sont réalisés pour chaque test.

4.1.1. Lecture

L'activité antimicrobienne a été déterminée en millimètre à l'aide d'une règle mesurant le diamètre de la zone d'inhibition et le résultat étant la moyenne des deux essais.

L'échelle de l'estimation de l'activité antimicrobienne est donnée par (Mata et al.,2007) ; ils ont classé les zones d'inhibition de la croissance en 5 classes :

- $D \geq 30\text{mm}$: très fortement inhibitrice.
- $21\text{mm} \leq D \leq 29\text{mm}$: fortement inhibitrice.
- $16\text{mm} \leq D \leq 20\text{mm}$: modérément inhibitrice.
- $11\text{mm} \leq D \leq 16\text{mm}$: légèrement inhibitrice.
- $D < 10\text{mm}$: non inhibitrice

4.2.Méthode de microdilution en milieu liquide

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) des huiles essentielles actives (celles représentant une grande activité sur les souches testées) sont déterminées par la méthode de microdilution sur milieu liquide BHIB.

Une gamme de dilution décroissante de demi en demi de l'HE a été réalisée dans 10 tubes au 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1024, à partir d'une solution mère contenant 225µl de l'HE. (Voir tableau VII).

Chaque tube contient 1.77ml de milieu liquide BHIB.

D'un tube à un autre commençant de la solution mère on prélève 1ml jusqu'au 10ème tube à partir duquel le dernier ml est jeté.

Au final, 5µl de la suspension bactérienne standardisée est ajoutée pour chaque tube. Deux témoins sont également réalisés : un témoin négatif contenant uniquement le BHIB, et un témoin positif contenant en plus du BHIB la suspension bactérienne.

Les tubes sont ensuite incubés à 37°C pendant 24h, la CMI est définie comme la plus faible concentration de l'HE qui ne montre aucune croissance bactérienne visible (pas de trouble visuel).

Les essais de détermination de la CMI sont limités à l'HE *Lavandula angustifolia* Mill et à la combinaison (25%H1+75%H2) pour *B. cereus* et *E.coli* respectivement.

Quant à la CMB, des boîtes gélosées sontensemencées avec 100µl de la suspension du tube ne présentant pas de turbidité visible.

Les boîtes sont alors incubées pendant 24h à 37°C, la CMB est la plus faible concentration qui inhibe toute culture visible sur gélose après la période d'incubation.

Tableau V : valeurs des dilutions déterminant la CMI

Rapport de dilution de l'HE	Solution mère	Tube1 1 /2	2 1/4	3 1/8	4 1/16	5 1/32	6 1/64	7 1/128	8 1/256	9 1/512	10 1/1024
%	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,5	0,78	0,4	0,2	0,1
HE µl /ml	127,11	63,55	31,77	15,88	7,94	3,97	1,98	0,99	0,49	0,25	0,12

Selon Koba et al., (2004) le pouvoir antibactérien d'une huile essentielle vis-à-vis d'une souche peut être classé comme suivant :

- CMI<50µl/ml : pouvoir inhibiteur excellent ;
- 50µl/ml<CMI<250µl/ml : pouvoir inhibiteur intéressant ;
- 250µl/ml<CMI<500µl/ml : pouvoir inhibiteur faible ;
- CMI >500µl/ml : pouvoir inhibiteur nul ;

Le rapport CMB/CMI peut être également calculé pour mettre en évidence la nature de l'effet antimicrobien des huiles essentielles testées. Lorsque le rapport est inférieur à 4, l'huile essentielle est considérée comme une huile essentielle bactéricide et lorsque le ratio est supérieur à 4, elle est considérée comme huile essentielle bactériostatique (Lakhdar et al.,2016).

4.3. Etude de la combinaison des huiles essentielles *Lavandula angustifolia* Mill et *Pinus sylvestris* L

Au sein de cette étude 3 combinaisons des deux huiles ont été effectuées (50%H1+50%H2, 25%H1+75%H2, 75%H1+25%H2) puis testées sur les huit souches de références représentées dans le tableau III. Cela est réalisé en utilisant le même protocole des deux méthodes citées précédemment :

- Méthode de diffusion de disque

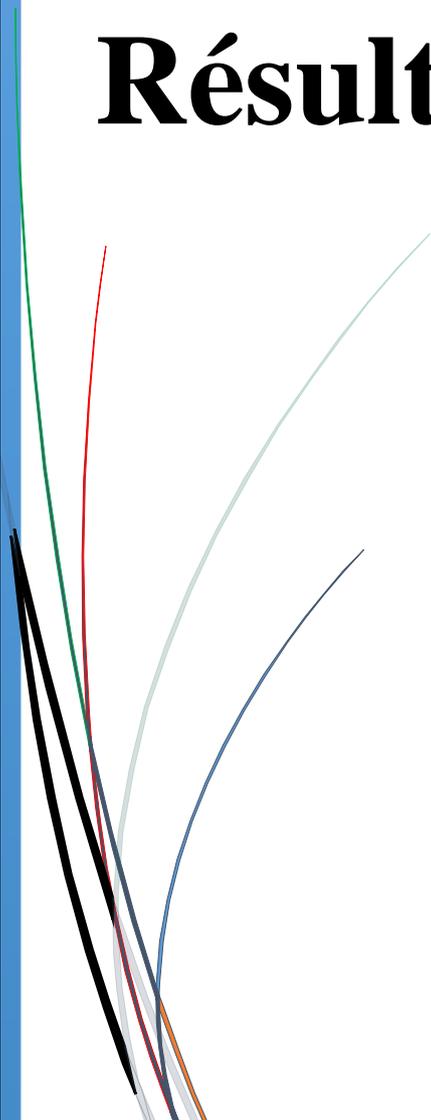
Pour chaque concentration 5µl de DMSO est additionné à 95µl de chaque combinaison obtenant ainsi des huiles diluées. En gardant le même principe les boîtesensemencées ont été laissées au réfrigérateur pendant 1heur puis incubées à 37°C pendant 24h.

Après l'incubation la mesure du diamètre d'inhibition en millimètre est réalisée (disque inclus).

- Technique de microdilution

Le mode opératoire de ce test est basé sur celui de la méthode de microdilution décrite dans la page précédente. Une seule souche a été choisie (*E. coli* ATCC 25922).

Résultats et discussion



III. Résultats

1. Résultats de la revérification de la pureté des souches

La pureté des souches a été vérifiée après 24h d'incubation à 37° C à l'examen macroscopique des colonies bactériennes sur gélose nutritive et microscopique après coloration de Gram.

Quelques photographies ont été prises et illustrées dans la figure ci-dessous.

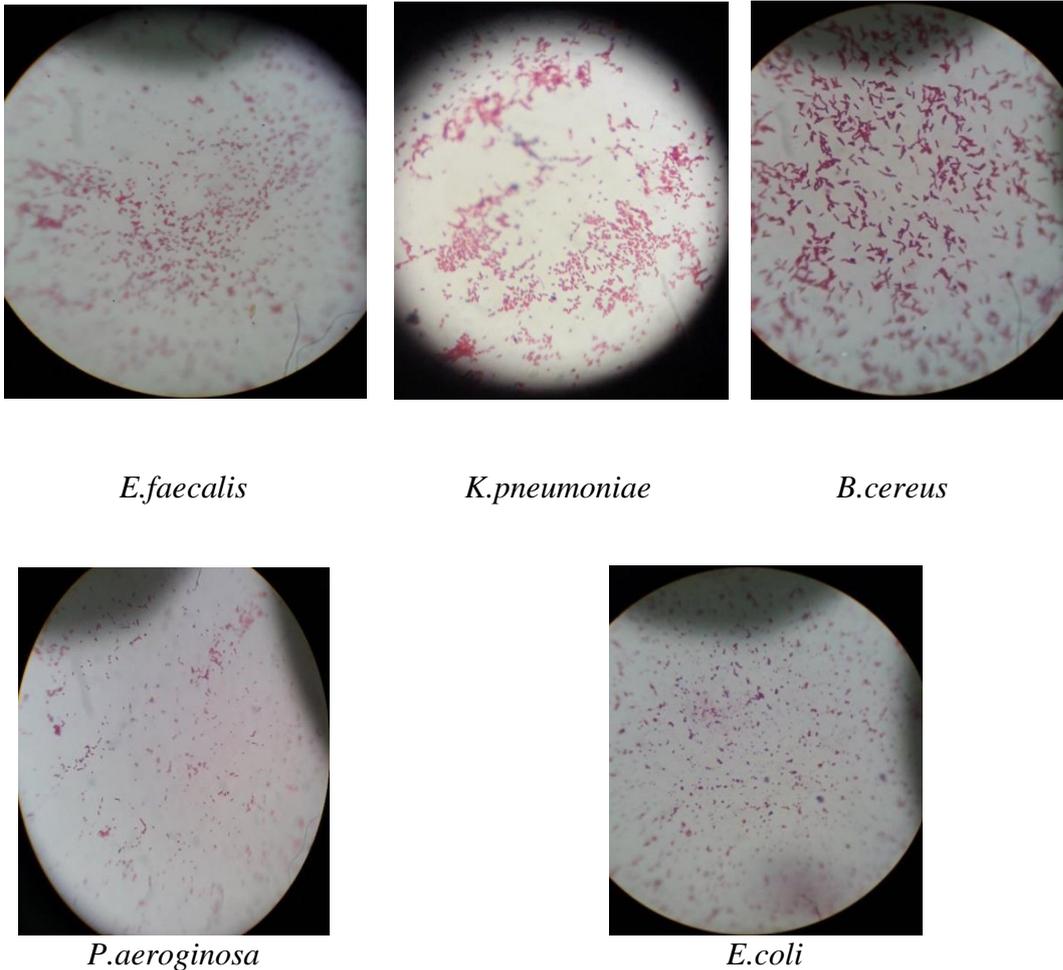


Figure 7 : Photographies des souches testées après coloration de Gram au microscope photonique au grossissement 100

2. Résultats de l'activité antimicrobienne des deux huiles essentielles

L'étude in vitro du pouvoir inhibiteur des huiles essentielles a été qualitative par l'estimation du diamètre de la zone d'inhibition autour des disques. Elle est aussi quantitative par la détermination de la CMI (Djabou et al.,2013).

En milieu solide, l'action antibactérienne des huiles essentielles testées se traduit par l'apparition ou l'absence d'un halo d'inhibition autour des disques (Figures 8,9).

1.1. *Lavandula angustifolia* Mill

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle pure *Lavandula angustifolia* Mill montre une forte activité sur la plupart des souches bactériennes. *E. coli*, *E. faecalis*(WDCM00009) et *C. freundii* sont les bactéries les plus sensibles.

D'autre part, on remarque que *S. aureus*, *P. aeruginosa* et *B. cereus* sont moyennement sensibles. Par contre *E. faecalis*(ATCC14579) et *K. Pneumoniae* étaient résistantes à cette huile essentielle, les résultats sont démontrés dans la figure8.

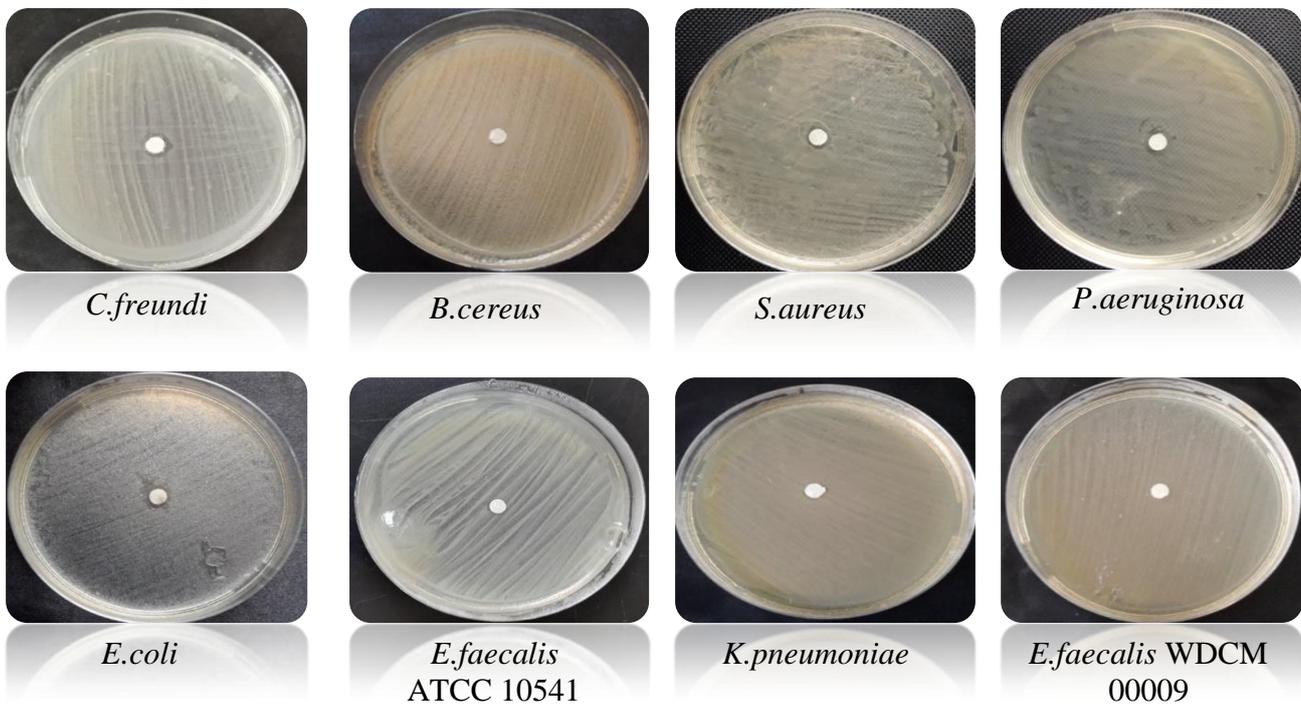


Figure 8 : Photographies correspondant aux résultats de l'activité antibactérienne de l'HE *Lavandula angustifolia* Mill

Les résultats étudiés sont illustrés dans Le tableau VI :

Tableau VI : Résultats de l'aromatogramme de *Lavandula angustifolia* Mill

souches bactériennes	Diamètre des zones d'inhibition en mm (diamètre du disque inclus)
<i>Enterococcus faecalis</i> WDCM 00009	12±0.00
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	9±1.41
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	9.5±0.70
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 10541	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	12±1.41
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	8±1.41
<i>Klebsiella Pneumoniae</i> ATCC 700603	-
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	11±1.41

- : absence de zone d'inhibition

2.2 *Pinus sylvestris* L

L'huile essentielle *Pinus Sylvestris* L montre une activité légèrement inhibitrice vis-à-vis des souches : *E. coli*, *K. Pneumoniae* et *B. cereus*, contrairement aux deux souches d'*Enterococcus faecalis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* et *C.freundi* où on a noté absence d'activité, les résultats sont démontrés dans la Figure9.

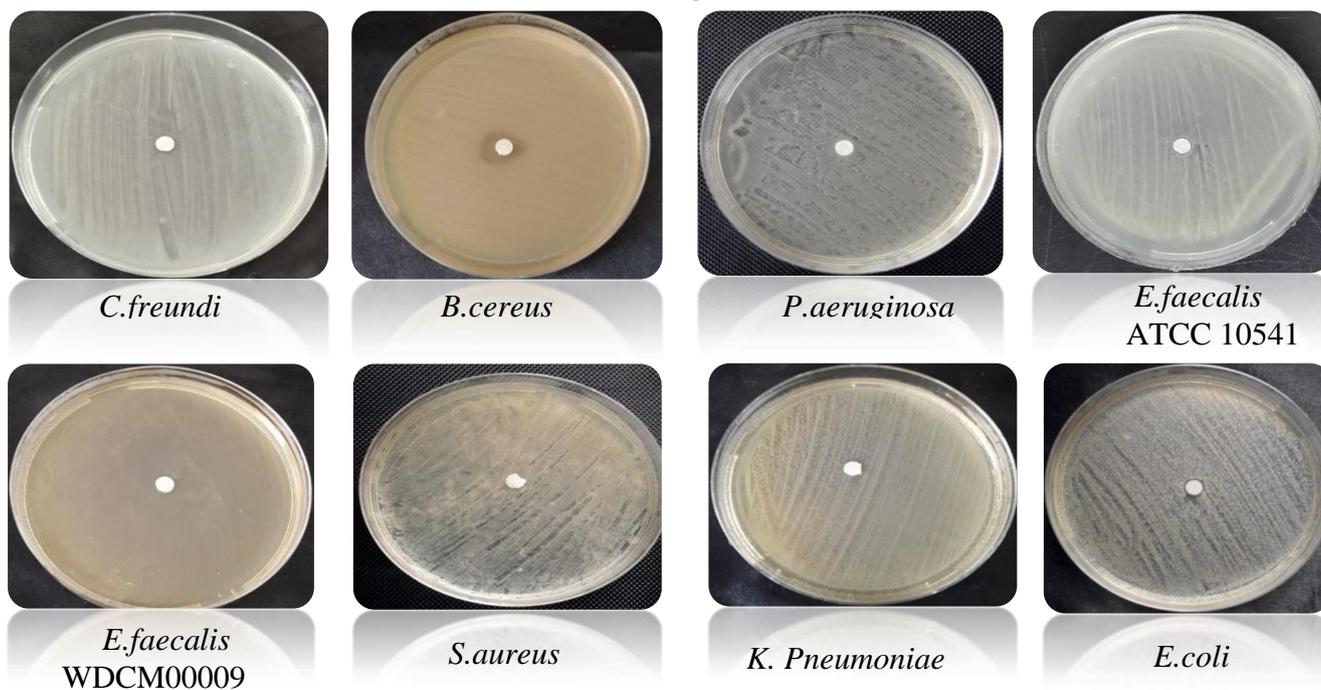


Figure 9 : photographies des résultats de l'activité antibactérienne de l'HE *Pinus sylvestris* L

Les résultats de l'activité de l'HE obtenus sont récapitulés dans le tableau VII.

Le tableau VII: Résultats de l'activité antimicrobienne du *Pinus sylvestris L* sur les souches testées

souches bactériennes	Diamètre des zones d'inhibition en mm (diamètres des disques inclus)
<i>Enterococcus faecalis</i> WDCM 00009	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	13.5±0.70
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 10541	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	8.5±0.70
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-
<i>Klebsiella</i> ATCC 700603	13±1.41
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	-

- : absence de zone d'inhibition

Enfin, les résultats des deux huiles ont été comparés à des témoins négatifs dont un tapis bactérien a été observé : ce qui signifie que le DMSO n'a pas d'effet sur les souches testées (les photographies sont illustrées dans la figure 10).

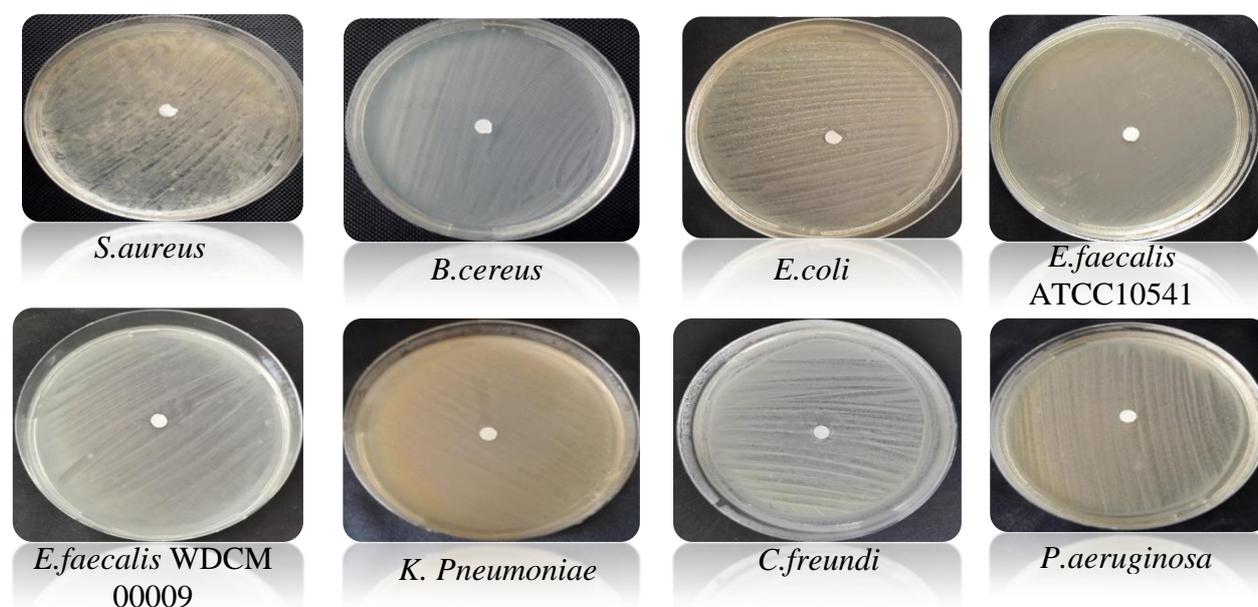


Figure 10: Résultats du test de témoin négatif (DMSO) réalisé sur l'ensemble des souches

Egalement les résultats des deux huiles ont été comparés à des témoins positifs où quelques antibiotiques testés se sont révélés très actifs vis-à-vis de ces souches (CN10, O30, FOX30, K30, V30 P, P10, AX25, N30, PEF), les résultats sont illustrés dans la figure 11 et tableau X.

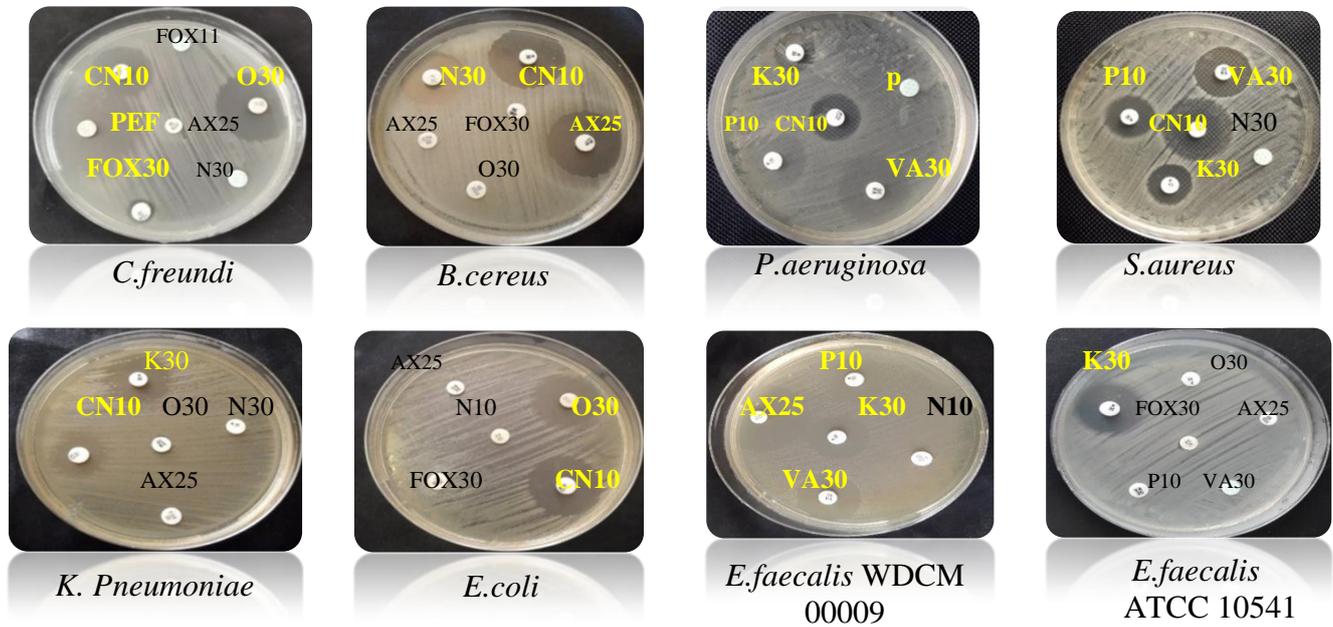


Figure 11 : Résultats du test témoin positif réalisé avec les ATBs sur l'ensemble des souches.

Les valeurs indiquées sont les moyennes des deux mesures et les diamètres des disques (6mm) sont inclus dans ces dernières \pm l'écart type

Tableau VIII : Diamètre des zones d'inhibition des témoins positifs

Les souches bactériennes	Les antibiotiques testés ainsi le diamètre des zones d'inhibition en mm (disque inclus)								
	CN10	O30	K30	VA30	FOX30	P10	AX25	N30	PEF
<i>Enterococcus faecalis</i> WDCM00009	-	-	23.5±0.70	24±1.41	-	24±1.41	34.5±4.94	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	25.5±0.70	-	16.5±0.70	20.5±0.70	-	16.5±0.70	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i> ATCC14579	27±0	-	29.5±0.70	-	-	-	-	24±0	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC10541	-	-	24±1.41	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	26.5±0.70	25±1.41	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	18±0	-	13.5±0.70	25±0.70	-	24±0.70	-	-	-
<i>Klebsiella</i> KP700603	20±0	-	26±0	-	-	-	-	-	-
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC8090	24.5±2.12	28±2.82	-	-	11±0	-	-	-	33±2.12

- : Absence de zone d'inhibition

Le tableau au-dessus montre que l'antibiogramme réalisé sur l'ensemble des souches pathogènes testées est révélé très actif sur la plupart d'entre elles, générant ainsi des zones d'inhibitions allant de 11 à 34.5mm.

Par ailleurs les souches, *K. Pneumoniae*, *P. aeruginosa* et *E.coli* sont sensibles uniquement à trois ATBs dont CN10, O30 et K30.

Par contre, *E.faecalis* ATCC 10541 était la souche la plus résistante sur l'ensemble des ATBs à l'exception de K30 avec une zone d'inhibition assez importante de 24mm.

D'après les résultats on constate que *Lavandula angustifolia* Mill exerce une activité remarquable sur les souches testées dont : *E.fecalis* (WDCM 00009), *S.aureus*, *B.cereus*, *E.*

coli, *P.aerogenosa* et *C.freundi* à l'exception de *E.fecalis* (ATCC 10541), et *K. Pneumoniae* ou elle ne présente aucune activité.

Par contre, *Pinus sylvestris L* est efficace uniquement envers : *K. Pneumoniae*, *B.cereus* et *E. coli*.

K. Pneumoniae est révélée la seule souche représentant une grande résistance aux deux HEs *Pinus sylvestris L* et *Lavandula angustifolia Mill*.

E.fecalis WDCM 00009 et *E. coli* sont les seules et uniques souches représentant une sensibilité aux deux HEs.

3. Résultats de la combinaison des deux huiles essentielles

Les huiles essentielles sont associées en fonction de leurs propriétés et compositions dans le but de créer de nouvelles fragrances.

La comparaison des résultats de l'activité antibactérienne des deux HEs *Lavandula angustifolia Mill* et *Pinus sylvestris L* ont montrées que les huit souches testées n'ont pas la même sensibilité vis-à-vis de ces essences.

Le résultat de combinaisons de plusieurs propriétés peut renforcer l'effet bénéfique de chaque huile essentielle. C'est-à-dire que le mélange de plusieurs huiles essentielles ayant des propriétés similaires donnera un produit plus « puissant ». Chaque mélange est unique. (Ahmed et Aqil, 2007).

Les résultats de notre étude sont démontrés dans le tableau XI et également dans la figure 10.

La figure 13 démontre les résultats de la combinaison des deux HES à 25% pour *Lavandula angustifolia* Mill additionnée à 75% du *Pinus sylvestris* L.

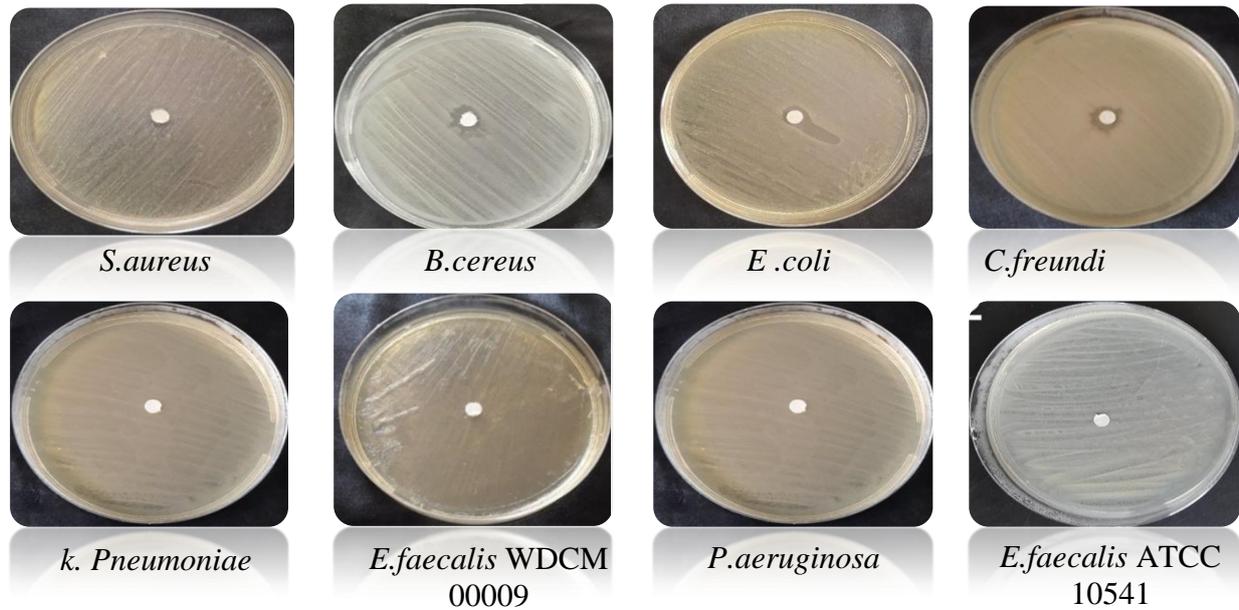


Figure 13 : Résultats de la combinaison des deux HES à (25% H1+75% H2)

La figure 14 démontre les résultats de la combinaison des deux HES à 50% pour *Lavandula angustifolia* Mill additionnée à 50% du *Pinus sylvestris*

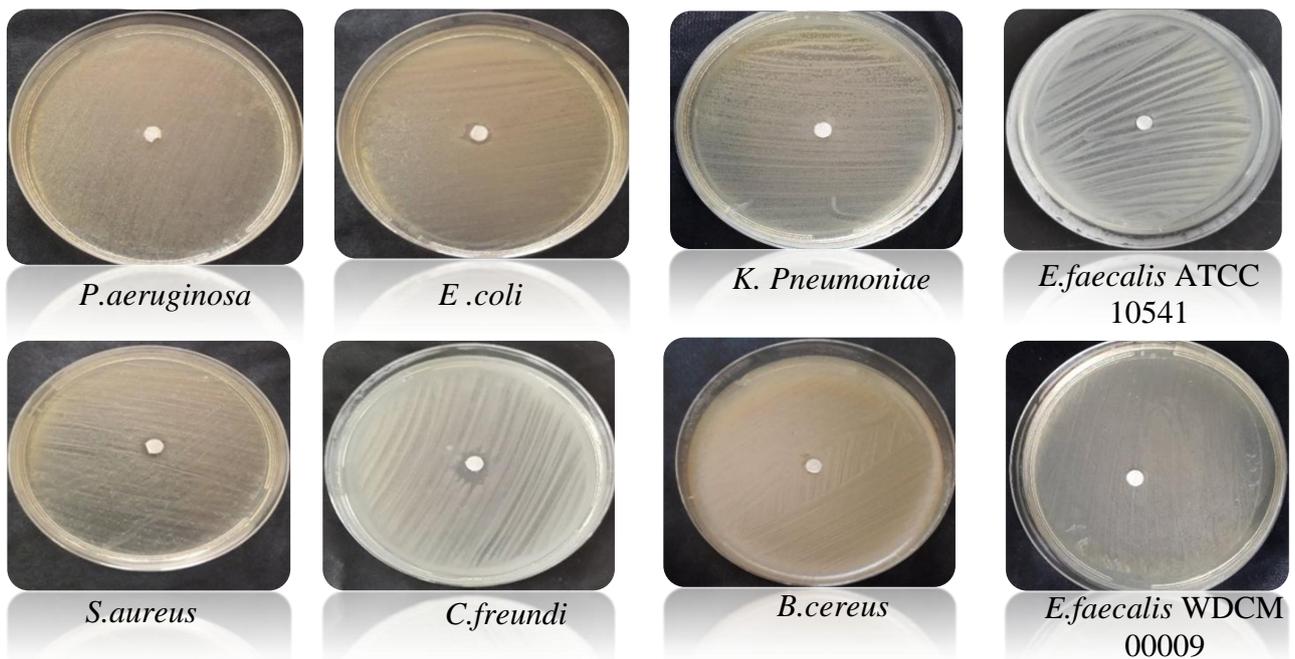


Figure 14 : Résultats de la combinaison des deux HES à (50% H1+50% H2)

H1 : *Lavandula angustifolia* Mill

H2 : *Pinus sylvestris* L

- ❖ D'après les résultats illustrés dans le tableau (11) et figure (12), *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), *Enterococcus faecalis* WDCM00009 et *Escherichia coli*

ATCC25922 sont les souches sensibles aux trois combinaisons avec des diamètres allant de 10mm jusqu'à 16mm.

- ❖ Par contre, *P.aeruginosa* ATCC27853, *E.faecalis* ATCC10541 et *K. Pneumoniae* ATCC700603 sont résistantes.
- ❖ *B.cereus* est sensible uniquement à la combinaison (25% *Lavandula angustifolia* Mill+75% *Pinus sylvestris* L) avec un diamètre de 13mm.
- ❖ *C.freundi* ATCC8090 est résistante à la combinaison (75% *Lavandula angustifolia* Mill +25% H2), mais sensible aux deux autres associations (50% *Lavandula angustifolia* Mill +50% *Pinus sylvestris* L) et (25% *Lavandula angustifolia* Mill +75% *Pinus sylvestris* L) avec des diamètres 13 et 14.5mm respectivement.
- ❖ D'après nos résultats on constate que les bactéries à Gram positif dont : *S.aureus* ATCC25923 et *E.faecalis* WDCM00009 , sont révélées les plus sensibles à nos huiles essentielles *Pinus sylvestris* L et *Lavandula angustifolia* Mill, puis *B.cereus* ATCC14579 est peu sensible (pour une seule association uniquement) à l'exception de la souche *E.faecalis* ATCC10541 qui est Gram positif et qui représente une sensibilité aux trois associations et donc aux deux huiles.
- ❖ Par contre les bactéries à gram négatif la plupart sont résistantes dont *P.aeruginosa* ATCC27853 et *K. Pneumoniae* ATCC700603, *C.freundi* ATCC8090 est peu résistante (uniquement à l'association 75% *Lavandula angustifolia* Mill +25% *Pinus sylvestris* L) à l'exception de *E.coli* qui est sensible aux trois associations.
- ❖ Il est à noter aussi qu'une grande sensibilité des souches est démontrée dans les combinaisons ayant des concentrations élevées de l'huile de *Pinus sylvestris* L..
- ❖ On comparant également les résultats du tableau XI aux résultats des tableaux précédents VIII et IX on peut déduire que l'huile essentielle *Lavandula angustifolia* Mill présente une activité antibactérienne importante lorsqu'elle est seule que lorsqu'elle est associée à la deuxième l'huile qui est *Pinus sylvestris* L.
- ❖ Comme il est à noter aussi que cette huile agit sur l'ensemble des souches étudiées avec des zones d'inhibition moyennement importantes, à l'exception de *K. Pneumoniae* ATCC700603. Par contre *Pinus sylvestris* L présente une activité importante avec des diamètres assez importants sur quelques souches uniquement dont *E.coli* ATCC25922, *K. Pneumoniae* ATCC700603 et *B.cereus* ATCC14579 avec des diamètres : 8,5 13.5 et 13mm respectivement.

4. Résultats de la CMI

Le résultat de la CMI est défini comme la plus faible concentration de l'HE qui ne montre aucune croissance bactérienne visible (pas de trouble visuel).

Le résultat de la microdilution en série réalisées avec l'huile *Lavandula angustifolia* Mill sur la souche d'*E.coli* ATCC25922 est illustré dans la figure 15.

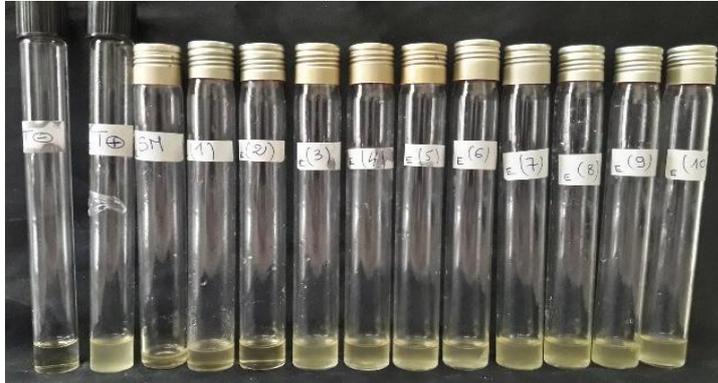


Figure15 : Microdilution en série réalisées avec l'association de 25% de *Lavandula angustifolia* Mill et 75% de *Pinus Sylvestris L* sur la souche d'*E.coli* ATCC25922.

Le résultat de la microdilution en série réalisées avec l'huile *Lavandula angustifolia* Mill sur la souche *B.cereus* est illustré dans la figure 16.



SM : Solution Mère T+ : Témoign positif T- : Témoign négatif

Figure16 : Microdilution en série réalisées avec la combinaison (25% *Lavandula angustifolia* Mill et 75% *Pinus sylvestris L*) sur *B.cereus* ATCC14579.

D'après la figure, il apparait que *B. cereus* ATCC14579 était résistante à la combinaison des deux HEs avec une CMI >127,11. µl/ml.

D'après Koba et al (2004), le pouvoir inhibiteur de l'huile *Lavandula angustifolia* Mill est excellent avec une concentration de 31.77 $\mu\text{l/ml}$ (CMI<50 $\mu\text{l/ml}$) obtenu dans le tube (2).

5.Résultats de la CMB

Les résultats obtenus après 24h d'incubation à 37°C sont illustrés dans la figure 17. Boîtesensemencées avec le tube (2) et (3) pour *E. coli* ATCC25922.

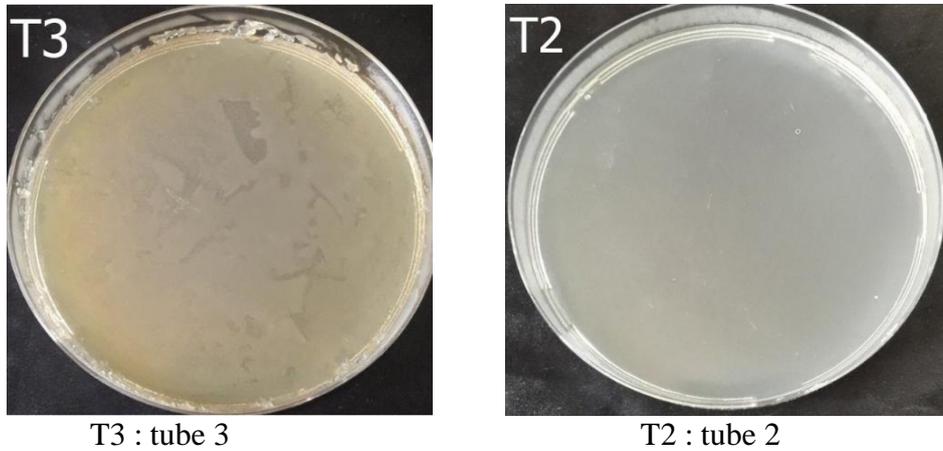


Figure17 : Résultats de la CMB obtenu pour la souche d'*E. Coli* ATCC25922.

D'après la figure on constate que l'effet de *Lavandula angustifolia* Mill sur *E. Coli* ATCC25922 est bactéricide, car l'inhibition est complète et aucune croissance n'est apparue.

IV. Discussion

Plusieurs facteurs biotiques ou abiotiques et également la régulation différentielle des divers constituants de l'huile essentielle peuvent influencer la composition chimique ou le chémotype d'une huile essentielle à une autre, ce qui rend chaque huile unique et différente et donc on constate une activité antibactérienne plus ou pas ou moyennement importante.

De nombreux facteurs écologiques tels que la température, l'humidité relative, l'insolation et la nature du sol peuvent influencer la composition chimique des huiles essentielles (Boira et Blanquer, 1998 ; Oliveira et al., 2005).

Selon Sangwan et al.(2001), il est plus délicat de juger que l'influence de la température sur la production d'essence par la plante tant les réactions sont variables et spécifiques à chaque espèce.

On sait que la plupart des espèces ne sont présentes que sur une plage d'altitude bien définie. Des études ont été menées pour déterminer l'influence de l'altitude à laquelle se développe la plante peut avoir sur son profil biochimique. Ainsi, il a été déterminé pour la lavande (*Lavandula angustifolia* Mill.) qu'un plant poussant à haute altitude produisait jusqu'à 10% d'esters (acétate de linalyle) de plus qu'un plant se développant à une altitude moyenne. La différence est la même pour un plant soumis à la sécheresse (Faucon , 2012).

L'activité antimicrobienne peut être influencée également par les familles des plantes, selon Hussain et al., (2009) la période de la récolte et la région ont un effet sur la famille des Lamiaceae tel que *Lavandula* et *Thymus*.

Les études portant sur la variation de la composition chimique des huiles essentielles en fonction de la période de récolte, du site de récolte ou encore du cycle végétal sont nombreuses (Tonzibo, 1998, Oussou, 2009, Kouamé, 2012).

La période de récolte est donc un facteur très important.

Il est établi aussi dans de nombreux travaux que l'activité d'une huile essentielle est en rapport avec les composés majoritaires des huiles (Dorman et Dreans, 2000, Saint et Kalemba et al., 2003, Oussou *et al.*,2008 , Oussou *et al.*, 2010), ont démontré que le thymol est le composé qui possède le plus large spectre d'activité antibactérienne contre 25 genres de bactéries testées.

Aussi, des études réalisées par l'organisation mondiale de la santé (OMS, 1999) ont également montré que ce constituant possède une forte activité antifongique et antibactérienne contre de nombreuses espèces y compris les bactéries étudiées.

Juven et al. (1994) et Lambert et al. (2001) ont expliqué le fait que le thymol se lie aux protéines membranaires et fait augmenter la perméabilité de la membrane cellulaire bactérienne.

D'autres études ont suggéré aussi que ce composé volatil est responsable de l'inactivation d'enzymes, y compris celles impliquées dans la production d'énergie et la synthèse des constituants de structure (Trombetta, 2005).

La présence de terpènes (par exemple, le linalool et l'acétate de linalyle) et de terpénoïdes (par exemple, le 1,8-cinéole), qui sont principalement responsables de leur saveur caractéristique et leurs propriétés biologiques et thérapeutiques (Laurence et al., 2015).

D'après les études menées par Kim *et al.* (2008) : le β -caryophyllène dont la teneur est de 15,20 à 8,06% chez *A. conyzoides* et de 9,67% chez *C. odorata* est connu pour être actif sur *S. aureus*.

Concernant notre étude l'activité antibactérienne des huiles essentielles étudiées serait alors attribuable à une ou plusieurs molécules actives dont l'Acétate de linalyle, linalol, cis- β -ocimène pour *Lavandula angustifolia* Mill et α -pinène, β -pinène pour *Pinus sylvestris* L. Le screening des propriétés antibactériennes des deux échantillons d'huiles essentielles, révèle qu'elles possèdent une activité antibactérienne vis-à-vis de l'ensemble des souches testées avec une légère différence de sensibilité entre les bactéries gram+ et gram-.

De façon générale, il a été observé une diversité d'actions toxiques des huiles essentielles sur les bactéries comme la perturbation de la membrane cytoplasmique, la perturbation de la force motrice de proton, fuite d'électron et la coagulation du contenu protéique des cellules (Davidson, 1997).

Le mode d'action des huiles essentielles dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leurs propriétés hydrophobes qui leur permettent de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne. Cela peut induire un changement de conformation des enzymes de la membrane, une perturbation chémo-osmotique et une fuite d'ions (K⁺): ce mécanisme a été observé avec l'huile de *Melaleuca alternifolia* sur les bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus*) et à Gram négatif (*E. coli*) et levure (*Candida albicans*) *in vitro* (Cox *et al.*, 2000 et Carson *et al.*, 2002).

Il est à noter aussi que les bactéries à Gram+ ont été un peu plus sensibles que les souches à Gram-, ceci est en accordance avec la majorité des travaux antérieurs.

En effet, les Gram- possèdent une résistance intrinsèque aux agents biocides, qui est en relation avec la nature de leur paroi bactérienne. Chez les bactéries à Gram+, le peptidoglycane est très épais et associé à des protéines pariétales exposées et à des structures polyosidiques (acides lipoteichoïques et acides teichoïques). En revanche chez les bactéries à Gram-, le peptidoglycane est très fin et associé à une enveloppe externe complexe définissant un espace périplasmique. Cette membrane externe est une bicouche lipidique asymétrique hydrophobe constituée de phospholipides, de protéines (porines) et de lipopolysaccharides (LPS). L'espace périplasmique est rempli d'enzymes qui dégradent les substances complexes pour qu'elles puissent traverser la membrane cytoplasmique, et inactivent les produits chimiques toxiques (antibiotiques).

La résistance des bactéries à Gram négatif aux glycopeptides et aux macrolides est due à l'incapacité de ces molécules à franchir la membrane externe. En revanche, de rares travaux rapportent l'inexistence de lien apparent, ni aucune corrélation entre l'activité inhibitrice des essences aromatiques et la nature de la paroi bactérienne (Boukhatem et al., 2014).

D'après les zones d'inhibition générées par les huiles essentielles étudiées, l'huile essentielle *Lavandula angustifolia* Mill présente la meilleure activité sur l'ensemble des souches testées. L'activité de l'huile essentielle *Pinus sylvestris* L reste active aussi mais sur certaines souches uniquement.

D'après la classification de Ponce et al. (2003), les zones d'inhibition, variant entre 8 et 13mm, indiquent que toutes les souches sont sensibles à l'huile essentielle des fleurs de *Lavandula officinalis*.

D'après les résultats obtenus, il apparait que les deux HEs inhibent la croissance des bactéries avec des degrés de sensibilité différents. Cette sensibilité est attribuée principalement à l'activité antibactérienne des molécules lipophiles capables de pénétrer la double couche phospholipidique, entraînant alors un changement de conformation et un mauvais fonctionnement de la membrane cellulaire (Calsamiglia et al., 2007).

Parmi les souches étudiées, *P. aeruginosa* s'est montrée résistante uniquement à *Pinus sylvestris* L . En effet, cette bactérie possède une résistance intrinsèque aux agents biocides, en relation avec la nature de sa membrane externe. Cette dernière est composée de lipopolysaccharides qui forment une barrière imperméable aux composés hydrophobes. En présence d'agents perméabilisant de la membrane externe, des substances inactives contre *P. aeruginosa* deviennent actives (Mann et al., 2000 et Bezic et al., 2013).

D'après Hammer *et al.*(1999) et Deans & Ritchie, (1987) il semble que cette souche se révèle résistante à un très grand nombre d'huiles essentielles.

Les diamètres générés par les huiles essentielles, qui sont des mélanges complexes de plusieurs molécules, sont nettement inférieurs à ceux produits par les antibiotiques et très variables selon l'huile utilisée.

Selon la classification de Duraffourd *et al.*(1990) , l'huile essentielle est considérée comme inactive si elle produit des diamètres d'inhibition inférieurs ou égaux à 8 mm, intermédiaire pour des diamètres compris entre 8 et 14 mm. Elle est moyennement efficace pour un diamètre entre 14 et 20 mm. Pour un diamètre supérieur ou égal à 20 mm l'huile est très efficace.

La sensibilité des souches à Gram positif vis-à-vis des antibiotiques peut s'expliquer probablement par la nature de leurs parois qui sont dépourvues de membrane externe et qui semble être sensibles aux changements environnementaux externes, tel que la température, le pH, et les extraits naturels (Balentine *et al.*,2006).

Les études de combinaison de substances médicinales sont de plus en plus souvent décrites dans la littérature (Rosato *et al.*, 2007 ; Coutinho *et al.*, 2011 ; Gauthami *et al.*, 2012; Thiago *et al.*, 2013 ;). Cette stratégie est en effet d'un grand intérêt en vue de potentielles applications cliniques, car permettant de réduire les éventuels effets secondaires des traitements actuels en diminuant la dose de composé utilisé (Rosato *et al.*, 2007), limitant ainsi également le développement des phénomènes de résistances.

C'est dans cette optique que l'huile essentielle *Lavandula angustifolia* Mill a été testée en combinaison avec *Pinus sylvestris* L sur les huit souches pathogènes.

La souche *E. faecalis* WDCM00009 est résistante aux deux HEs, mais sensibles aux trois combinaisons. Comme il a été démontré par (Essawi et Srour,2000) : l'efficacité d'un extrait ne peut pas être dû à un constituant actif majoritaire , mais plutôt à l'action combinée de différents composés.

Par contre Wang *et al.*,(2008) ont démontré qu'une huile essentielle entière exerce une activité antimicrobienne supérieure qu'un mélange de composants majeurs de la même huile essentielle, ce qui suggère que les composants mineurs peuvent avoir un effet synergique.

On note que la concentration des huiles essentielle influence l'activité inhibitrice ; selon Karagoz *et al.*, (2010) ; plus la concentration de l'extrait augmente plus les diamètres d'inhibitions sont importants.

En effet, Thiago *et al.*,(2013) ont mis en évidence des phénomènes de synergie pour la

Combinaison de l'huile essentielle de *Croton campestris* avec les aminosides et les quinolones sur l'inhibition de la croissance de *S. aureus* et *P. aeruginosa*.

Coutinho *et al.*, (2011) ont démontré que l'extrait de *Croton campestris* potentialise l'action de la norfloxacine sur des souches multi résistantes de *S. aureus*. Les méthodes en phase vapeur sont utilisées dans les études de combinaisons de substances naturelles et antibiotiques.

La combinaison des huiles essentielles de *Zanthoxylum articulatum*, *Vanillosmopsis arborea*, *Lippia microphylla* et *Croton zehntneri* avec les aminoglycosides et quinolones, est efficace sur *S. aureus* et *P. aeruginosa* (Rodrigues *et al.*, 2009 et Coutinho *et al.*, 2011). Pour notre étude *S. aureus* est révélée sensible aussi envers les combinaisons de deux huiles. Par contre la souche de *P. aeruginosa* est résistante et c'est le cas également pour *Klebsiella* et *E. faecalis* ATCC25922.

La combinaison est considérée comme synergique lorsque le diamètre d'inhibition est supérieur à 5mm (Ahmed et Aqil, 2007). Ce qui a été démontrée et confirmée pour nos deux HEs *Pinus sylvestris* L et celle de *Lavandula angustifolia* Mill Combinées à différentes concentrations avec des zones d'inhibition allant de 10 à 18.5mm et qui sont considérées donc comme synergique.

Pertamawati et Nuralih (2008), ont montré que l'huile essentielle de *A. conyzoides* est plus active sur les bactéries Gram positif que sur les bactéries Gram négatif ; par contre elle est inactive sur toutes les souches de *Pseudomonas aeruginosa*.

Les résultats de notre étude ont montré que l'huile essentielle *Lavandula angustifolia* Mill inhibe la croissance des souches d'*E-coli* ATCC25922 avec des CMI à 31.77µl/mL.

Les résultats des CMI obtenus par la méthode de microdilution montrent qu'ils ne sont pas corrélés avec ceux obtenus par la méthode des disques ; l'activité de l'HE *Lavandula angustifolia* Mill s'avère plus efficace aussi bien en milieu liquide qu'en milieu solide, contrairement à celle de *pinus sylvestris* L qui se montre moins efficace. Ces résultats sont en concordance avec ceux trouvés par (Djenane *et al.*, 2012), cela peut s'expliquer par la diversité moléculaire des huiles qui ne réagissent pas de la même manière, la composition et la concentration de l'HE et sa solubilité dans le milieu utilisé (propriété hydrophobe des huiles).

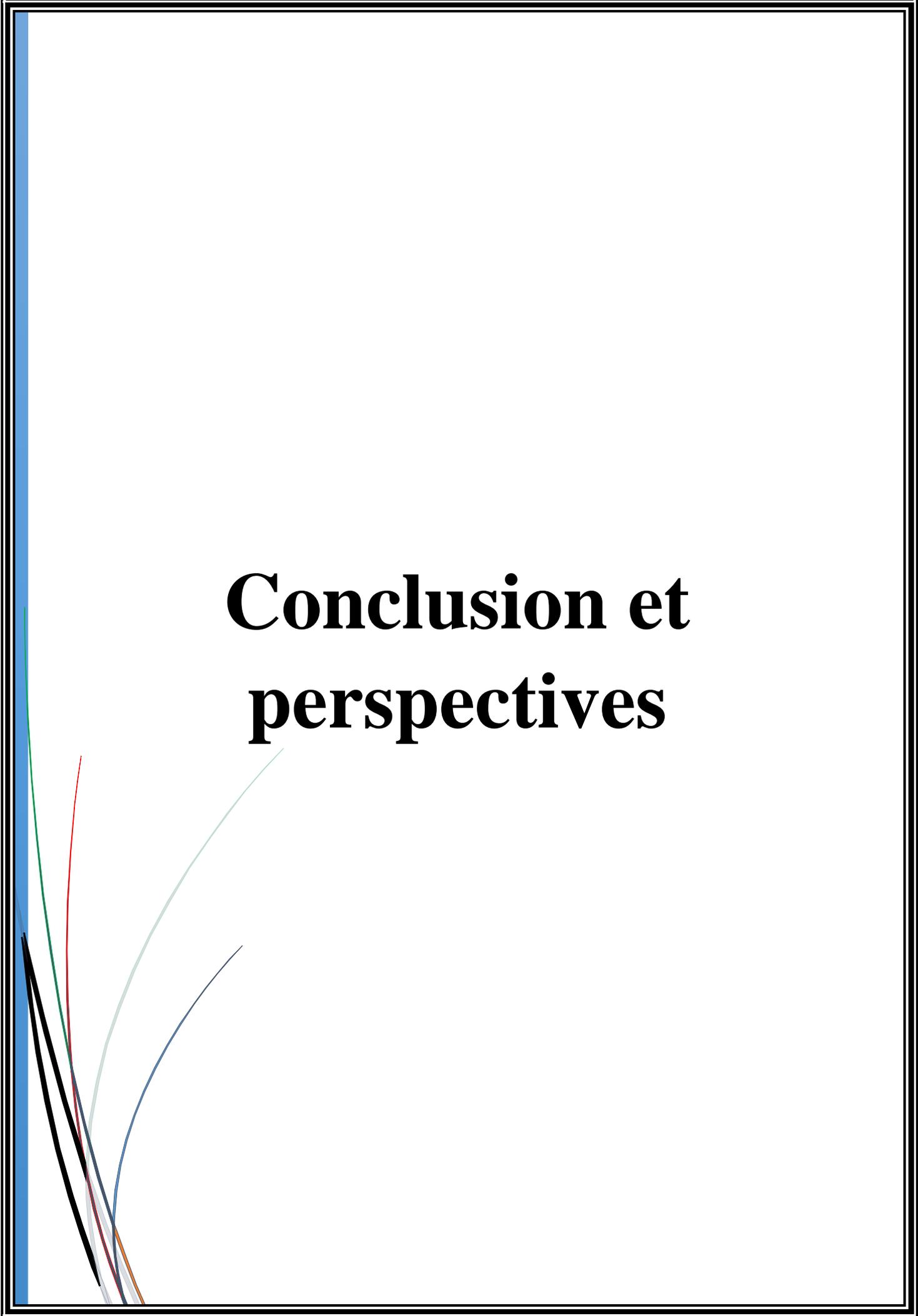
Matias *et al.* (2010) ont mis en évidence les propriétés antibactériennes de l'extrait hexanique des feuilles de *Croton. campestris* sur *S. aureus*.

Les bactéries les plus sensibles à l'action des huiles essentielles étudiées sont les bactéries Gram positif. Cependant *B.cereus* présente une CMI très basse (127.11 µg/mL).

Cela s'explique par l'organisation structurale de la paroi cellulaire des bactéries à Gram positif qui est moins complexe que celle des bactéries à Gram négatif. Cette différence structurale la rend moins sensible à l'action des huiles essentielles et des extraits de plantes.

Deans et *al.*(1995), apportent que la susceptibilité des bactéries Gram positif et Gram négatif vis-à-vis des huiles essentielles à une légère influence sur l'accroissement du degré d'inhibition. Cependant, il apparait que beaucoup d'huiles volatiles exercent une activité importante envers les bactéries Gram positif; comme il est souvent apporté que les bactéries Gram négatif sont plus résistantes aux plantes à base d'huile essentielle (Reynolds, 1996).

L'essence *Pinus sylvestris L* et celle de *Lavandula angustifolia Mill* sont rapportées comme étant des huiles essentielles actives, mais la comparaison des résultats est assez difficile pour diverses raisons : Les souches bactériennes utilisées ne sont pas toujours les mêmes ; Les échantillons de plantes utilisés sont d'origines géographiques différentes, ce qui fait intervenir le phénomène de polymorphisme chimique ; Les conditions et les méthodes utilisées ne sont pas toujours les mêmes.



Conclusion et perspectives

Conclusion

De tout temps, les propriétés désinfectantes et bactéricides de certaines plantes aromatiques ont jouées un rôle primordial dans l'hygiène, la prévention et le traitement de certaines pathologies. L'aromathérapie est un art, mais aussi une science qui concerne l'utilisation en toute sécurité et avec efficacité des huiles essentielles pour procurer un bien être psychologique ainsi qu'un bien être physiologique.

La présente étude nous a permis d'évaluer l'activité antibactérienne des deux huiles essentielles *Lavandula angustifolia* Mill et *Pinus sylvestris* L et l'effet de leur association à différentes concentrations dont l'un des objectifs majeurs est la recherche de nouveaux principes actifs afin de valoriser les plantes utilisées en médecine.

Les deux huiles essentielles se sont révélées inhibitrices contre les souches testées ; l'huile essentielle *Lavandula angustifolia* Mill a manifesté le plus grand pouvoir antibactérien avec des zones d'inhibition allant de 8mm pour *P.aerogenosa*, à 12 mm pour *E.faecalis*(WDCM00009) et *E.coli*.

Par contre l'huile du *Pinus sylvestris* L s'est montrée moins active avec des zones d'inhibitions allant de 8,5 à 13,5 mm pour *E.coli*, *Klebsiella* et *B.cereus*. Mais les autres souches testées se sont montrées résistantes. Ce qui peut s'expliquer par leur profil chimique riche en composés connus pour leur pouvoir antibactérien tels que les cétones.

Les résultats de l'association des deux huiles essentielles étudiées à différentes concentrations ont donnés également des résultats importants et différents. Les souches : *E. faecalis* WDCM00009, *S. aureus* ATCC25923 et *E.coli* ATCC25922 se sont montrées sensibles pour les trois combinaisons d'huiles ; *Citrobacter* est sensible pour les deux associations (50% *Lavandula angustifolia* Mill+50% *Pinus sylvestris* L) et (25%*Lavandula angustifolia* Mill+ 75% *Pinus sylvestris* L) et *Bacillus cereus* uniquement pour cette dernière combinaison.

E. faecalis ATCC10541, *P.aeruginosa* ATCC27853 et *K. Pneumoniae* ATCC700603 se sont montrées résistantes pour toutes les combinaisons.

Les trois combinaisons des deux essentielles *Pinus sylvestris* L et celle de *Lavandula angustifolia* Mill à différentes concentrations sont considérées comme synergiques avec des zones d'inhibition allant de 10 à 18.5mm.

Conclusion

En ce qui concerne la détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices par la méthode de microdilution en milieu liquide, seulement la souche d'*E.coli* ATCC25922 a été inhibée sous l'action de la *Lavandula angustifolia* Mill à une concentration de 31.77 μ L/ml ; Cependant, *Lavandula angustifolia* Mill a exercée une action bactéricide sur *E.coli* car l'inhibition est complète et aucune croissance n'est apparue.

Ces résultats préliminaires obtenus s'avèrent prometteurs dans l'élargissement de l'arsenal thérapeutique des plantes dotées de propriétés antibactériennes. Leur criblage permettrait de découvrir de nouveaux antibactériens, qui pourraient constituer une alternative à l'usage des antibiotiques conventionnels devenus inefficaces.

Cette étude confirme l'intérêt des huiles essentielles offrant ainsi un patrimoine à préserver, à développer et à valoriser, dans la mesure où nos résultats constituent, avec ceux des études réalisées auparavant, une base essentielle en faveur de leur exploitation dans différents domaines.

Perspectives

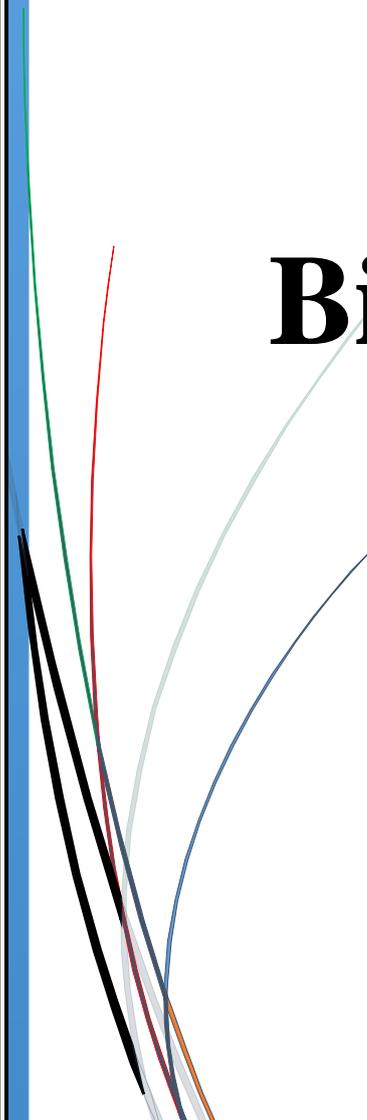
Toutefois, ces résultats restent préliminaires et afin de les approfondir, d'autres approches et études sont souhaitables à réaliser:

- Détermination et étude de profil de ces deux HEs par la technique d'analyse CG-SM
- Etude du mécanisme d'action des HEs.
- nous proposons d'étendre cette étude à bon nombre d'huiles essentielles sur des bactéries multi-résistantes,
- Comme il serait intéressant également d'établir des synergies de différents composés de diverses plantes en plus d'étudier d'autres propriétés biologiques de ces plantes, à savoir les propriétés antifongiques, anti-inflammatoires, antivirales, antiparasitaires et insecticides.
- Elargir l'étude antibactérienne sur la majorité des souches pathogènes provoquant des maladies graves.

Cependant, les méthodes *in vitro* utilisées pour confirmer l'activité antibactérienne des différents extraits sont insuffisantes et nécessitent d'autres tests supplémentaires plus avancés tels que l'étude de l'activité antibactérienne *in vivo*.

Par ailleurs, il y a encore trop souvent d'erreurs d'administration dues au manque de connaissances et aux confusions faites entre les différentes espèces.

Un changement à l'avenir concernant l'encadrement et la réglementation des huiles essentielles serait à envisager afin de limiter tout risque de mauvais usage.



Références

Bibliographique

Références

- **ANSM, 1965.** : *Pharmacopée française*. 8 éditions.
- **A.Meyer.J.Deiana.H.Leclerc ; Koba K., Sanda K., Raynaud C., Nenonene Y., Millet J., et Chaumont J.P., 2004.** Activités antimicrobiennes des huiles essentielles de trois *Cymbopogon sp* Africains vis-à-vis de germes pathogènes d'animaux de compagnies. *Annales de Médecine Vétérinaire*,148 :202-206.
- **AGKERMAN A., ERKEY C. OREJUELA M., 1976.** Limiting diffusion coefficients of heavy molecular weight organic contaminants in supercritical carbon dioxide. *Ind. Eng. Chem. Res*, 35 (3), pp 911–917.
- **Ahmed I. & F.Aqil., 2007.**In vitro efficacy of bioactive extracts of 15 Medicinal plants against ESBL-producing multidrug-resistant enteric bacteria. *Microbiological Research*, 162 :264-275).and antimicrobial activity of essential oils of two populations of Tanzanian *Lippia*
- **Anton R. Iobstein A., 2005.** Plantes aromatiques.epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Tec et doc, paris 522p.
- **Armstrong, J. S., 2006.** Mitochondrial membrane permeabilization : the sine qua non for cell death. *BioEssays* 28, 253-260.
- **Avlessi F., Alitonou G.A., Djenontin T S., Tchobo F., Yèhouénoù B., Menut C. & Sohounhloué D., 2012.** Chemical composition and Biological activities of the Essential oil extracted from the Fresh leaves of *Chromolaena odorata* (L. Robinson) growing in Benin. *ISCA Journal of Biological Sciences*, **1(3)**: 7-13.
- **Avlessi F., Alitonou G.A., Djenontin T S., Tchobo F., Yèhouénoù B., Menut C. & Sohounhloué D., 2012.** Chemical composition and Biological activities of the Essential oil extracted from the Fresh leaves of *Chromolaena odorata* (L. Robinson) growing in Benin. *ISCA Journal of Biological Sciences*, **1(3)**: 7-13.
- **Avlessi F., Alitonou G.A., Djenontin T S., Tchobo F., Yèhouénoù B., Menut C. & Sohounhloué D., 2012.** Chemical composition and Biological activities of the Essential oil extracted from the Fresh leaves of *Chromolaena odorata* (L. Robinson) growing in Benin. *ISCA Journal of Biological Sciences*, **1(3)**: 7-13.
- **Babili F.E., Moulis C., Bessiere J.M., Roques C. & Haddioui L., 2009.** Essential oil leaves of *Croton campestris* St. Hilaire, its secretory elements, and its biological activity. *Journal of Essential Oil Research*. **21**: 272–275.

- **Bakkali, 2007.** Biological effects of essential oils. A review, food. Chn, toxicol.
- **Balentine CW.,Crandall PG.,O'Bryan CA.,Duong DQ.,Pohlman FW., 2006.** The pre and post-grinding applications of rosemary and its effects on lipid oxidation and color during storage of ground beef. *Meat science*.73:413-421.
- **Bardeau F., 1976.** La médecine par fleurs .Ed.Robert Laffont.
- **Barkat, M. et Imène, L., 2011.** Composition chimique et activité antioxydante de l'huile essentielle des fleurs séchées de *Lavandula officinalis*. *Revue de génie industriel* ; 6 : 46-54.
- **Baudoux D., Breda M., Zhiri A., 2012.** Aromathérapie scientifique : Huiles essentielles chémotypées. 1e éd. Belgique : J.O.M, 98 pages.
- **BAUDOUX, D., 2007.** Le formulaire d'aromathérapie pratique pour le prescripteur et le conseil pharmaceutique Edition Inspir.
- **Baysal T. et Starmans D.A.J., 1999.** Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Carvone and Linalene from Caraway Seeds, *Journal of Supercritical Fluids* 14, p: 225-234.
- **Bernard T. , Periau F., Brav D., Delmas M., et Gaset A., 1988.** Extraction des huiles essentielles .chimie et technologie.Information chimie.
- **Brumeton J., 1993.** Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. Tec et doc, lavoisier, paris : 915
- **Bruneton J., 1995.** Pharmacognosie-phytochimie , plantes medicinales , Tec et Doc , Paris 1119.
- **Bruneton J., 2009.** Pharmacognosie : Phytochimie : Plantes médicinales. 4e éd. Paris : Tec & Doc, 1269 pages.
- **Burt, S., 2004.** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253
- **C. Bonnafous Ph.D., 2013.** Traité scientifique aromathérapie aromatoologie et aromachologie. Editions Dangles ; Escalquens, Chemical composition, antibacterial and antibiotic modulatory effect of Croton. *Industrial Crops and Products*, **44** : 630–633.224.559.
- **Calsamiglia S, Busquet M, Cardozo PW, Castillejos L et Ferret A., 2007.** Invited Review : Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*. 90, 2580- 259.
- **Carson, C. F., Mee, B. J., & Riley, T. V., 2002.** Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill,

lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46, 1914-1920.

- **Catherine Regnault-Roger et Abdelaziz Hamraoui.** Published online **27 april 2013.** pages 401-412
- **Celiktas, O.Y., Hames Kocabas, E.E., Bedir, E., Vardar Sukan, F., Ozek, T., Baser, K.H.C., 2007.** Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chem.*, 100: 553-CMI de 5 et 10 µg/ml respectivement et ceci est en accord avec nos résultats.
- **COUIC-MARINIER F., Juillet 2009.** Huiles essentielles : l'essentiel. Conseils pratiques en aromathérapie pour toute la famille au quotidien. Centre alsacien de reprographie.
- **Coutinho H.D.M., Matias E.F.F., Santos K.K.A., Santos F.A.V., Morais-Braga M.F.B., Souza T.M., Andrade, J.C., Souza C.E.S., Tintino S.R., Guedes G.M.M., Falcão- Silva, V.S., Siqueira-Júnior, J.P., Costa J.G.M., 2011.** Modulation of the norfloxacin resistance in *Staphylococcus aureus* by *Croton campestris* A. and *Ocimum gratissimum*. *Biomédica*, 31: 608-612.
- **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.
- **Cu J.Q., Ziouani H., Martel J.P. et Perineau F., 1999.** Production d'huile essentielle de Badiane de Chine par turbo-distillateur ; Parfums, Cosmétiques, Arômes 93, p: 67-74.
- **Festy D., 2008.** Ma bible des huiles essentielles. Editions Quotidien Malin ; Paris.
- **Roux-Sitruk D., 2008.** Conseil en aromathérapie. Editions Groupe liaisons ; 2ème éditions ; Paris.
- **Davidson P.M., 1997.** Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: M. P. Doyle, L. R. Beuchat and T. J. Montville (eds.) ASM, Washington. *Food Microbiology*. 520-556 p.
- **DAVIS, P., 2006.** L'aromathérapie de A à Z Edition Vigot.
- **Deans S.G. & Ritchie G., 1987.** Antibacterial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology* 5:165-180.

- **Dijoux, N., Guingand, Y., Bourgeois, C., Durand, S., Fromageot, C., Combe, C., & Ferret, P. J., 2003.** Assessment of the phototoxic hazard of some essential oils using modified 3T3 neutral red uptake assay. *Toxicol. in vitro*, 20, 480-489.
- **Djenane D, Aider M , Yanguela J , Idir L , Gomez D , Roncalès P., 2012.** Antioxidant and antibacterian effects of *Lavandula* and *Mentha* essential oils in minced beef inoculated with E-coli O157 :H7 and S.aureus during storage at abuse refrigeration temperature. *Meat Science*.92, 667-674.
- **Duraffourd C., D'Hervicourt L. & Lapraz J.C., 1990.** Cahiers de phytothérapie clinique. 1. Examens de laboratoires galénique. Eléments thérapeutiques synergiques. 2ème éd. Masson, Paris.
- **E. Miles.** Les huiles essentielles pour les nuls. Editions First-Gründ ; Paris ; 2013
- **Essawi T., Srour M ., 2000.** Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *J. Ethnopharmacol.* 70:343-349.
- **Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdelly, C., 2008.** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities . *C. R. Biologies*, 331: 372-379.
- **FAUCHERE et AVRIL, A.R., Albuquerque, F.A.A., Rao, V.S.N., Maciel, M.A.M., Pinto, A.C., 2002.** Investigations on the antinociceptive activity of crude extracts from *Croton cajucara* leaves in mice. *Fitoterapia* 73(2):116-120.
- **Faucon M., 2012.** *Traité d'aromathérapie scientifique et médicale*. Sang de la terre, 880p.
- **Fernandez x. , Chemat F.** La chimie des huiles essentielles .Edition Vuibert (2012). 288p
- **FRANCHOMME P., JOLLOIS R. PENOEL D. :** L'Aromathérapie exactement : encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des extraits aromatiques. Edition Roger Jollois. 2001.
- **Franchomme P. Pénéol D. 2001.** L'aromathérapie exactement .Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles Roger Jollois, 445p.
- **Garneau F.X., 2005.** *Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation - Manuel pratique*. Corporation Laseve, Université du Québec à Chicoutimi, 185p.
- **Gauthami R., Sudhakara R.G, Karthik K., 2012.** Evaluation of Antibacterial Effect of *Vernonia Anthelmintica* seed Extract and Its Synergistic Effect with

Antibiotics on Resistant Bacterial Strains. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, **3**: 79-81.

- gramme : page 32).
- **Gustafson, J. E., Liew, Y. C., Chew, S., Markham, J. L., Bell, H. C., Wyllie, S. G., & Warmington, J. R., 1998.** Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*, *26*, 194-198.
- **Hammer K.A., Carson C.F. & Riley T.V., 1999.** Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts, *Journal of Applied Microbiology*. **86**: 985–990.
- **Houbairi, S., Elmiziani, I., Lamiri, A., et Essahli, M., 2015.** Comparison of the antioxidant activity of aromatic medicinal plants of Moroccan origin. *European journal of medicinal plants*, *10*(4):1-10.
- **Huet Raymond.1991.** Les huiles essentielles d'agrumes. *Fruits*, *46*(4), pages 501-513.
- **Hoare J., 2012.** Le guide des huiles essentielles et leurs applications thérapeutiques. Editions Le courrier du livre ; Paris.
- **Kaloustian, J. et F. Hadji-Minaglou., 2012** La connaissance des huiles essentielles, qualité et aromathérapie. Editions Springer Verlag ; Paris .
- **Burm F. (javanica) & Spreng (Verbenaceae).** *Flavour and Fragrance Journal* *18*, 221-
- **Jiajia Rao. , March 2019.** Annual review of food science and technology.
- **Kalemba D. & Kunicka A., 2003.** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*. **10**: 813-829.
- **Keefover-Ring K., Thompson J.D., Linhart Y.B., 2009.** *Beyond six scents: defining a seventh Thymus vulgaris chemotype new to southern France by ethanol extraction.* *Flavour and fragrance journal*, *24* : 117-122.
- **Keville K. et Green M., 1995.** Aromatherapy: A complete guide to healing art, Ed 1: The Crossing Press; p: 120-140.
- **Kim Y.S., Park S.J., Lee E.J., Cerbo R.M., Lee S.M., Ryu C.H., Kim G.S., Kim J.O., Ha Y.L., 2008.** Antibacterial compounds from rose bengal-sensitized photooxidation of α -caryophyllene. *Journal of Food Chemistry*. **73**:540-545.
- **LABIOD Ryma 2016 :** Valorisation des huiles essentielles et des extraits de *Satureja calamintha nepeta* : activité antibactérienne, activité antioxydante et activité fongicide.
- **Lahlou, M., & Berrada, R., 2001.** Potential of essential oils in schistosomiasis control in Morocco. *International Journal of Aromatherapy*, *11*, 87-96.

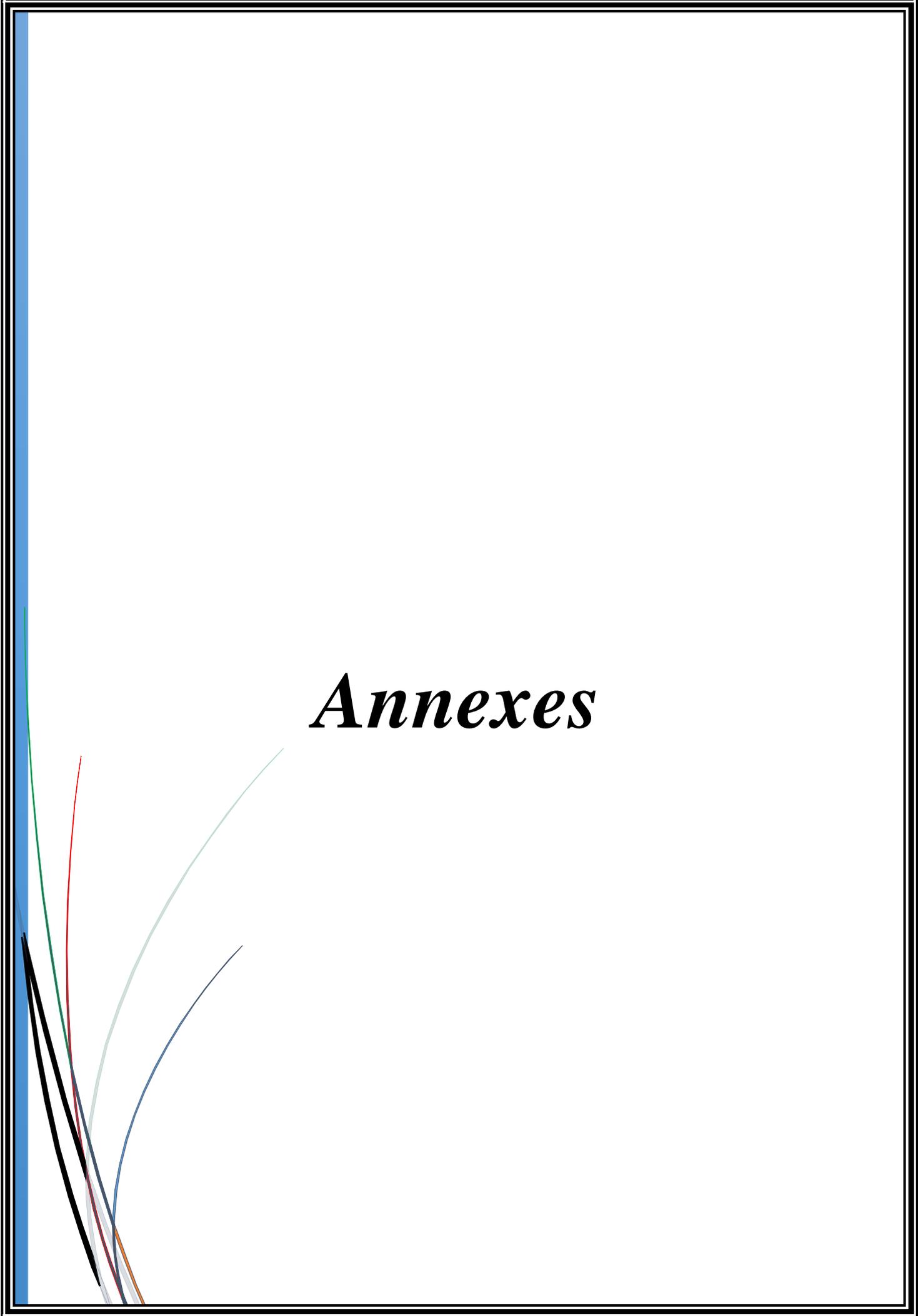
- **Lakhdar L., Ennibi O.K., Farah A., 2016.** Composition pharmacologique de l'origan(huile essentielle) a effet antibacterien sur *d'Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, brevet WO 2016076689 AL.)
- **Lamberg. 1982.*Armoise*Artémisi herba alba.**Perfumer flavorist,7,p58-63.
- **Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, 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.
- **Lardry J.M. et Haberkorn V., 2007.** Les Huiles Essentielles : principes d'utilisation, *Kinesitherapy Reviews* 61, p: 18-23.
- **Legrand.1978.**Manuel préparatoire en pharmacie .8^{ème} éd.Massou.
- **Mann C.M., Cox S.D. & Markham J.L., 2000.**The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749 contributrs to its tolerance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Tea tree oil). *Letters in Applied Microbiology*, 30: 294-297.
- **Mann C.M., Cox S.D. & Markham J.L., 2000.**The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*
- **Mata A.T.; Proença C.; Ferreira A.R.; Serralheiro M.L.M.; Nogueira J.M.F & Araújo, M.E.M., 2007.**Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as portuguese food spices. *Food Chemistry*,103: 778–786.
- **Matias E.F.F., Santos K.K.A., Costa J.G.M. & Coutinho H.D.M., 2010.** Light-enhanced antibiotic activity of Brazilian medical plants (*Croton campestris*, *Ocimum gratissimum* and *Cordia verbenaceae* DC). *Asian Biomed*, 1 :183–186.
- **Milijaona, R., Rasidimanana, V., Rabarison, H., Cheplogoi, P. K., Ratsimbason, M.,Mulholland, D. A., & Mauclère, P., 2003.** Plant traditionnally prescribed to treat tazo (malaria) region of Madagascar *Malaria journal*, 2, 25.
- **MOREL J-M., 2008.** Traite pratique de phytotherapie : remedes d'hier pour medecin de demain. Editions Jacques Grancher. Septembre 2008.
- **Purchon, N., 2008.** Huiles essentielles, initiation à l'aromathérapie. Editions de Noyelles ; Paris.
- **Soualech,N. et Soulimani,R.,Fevrier 2016.** plant essential oils and volatile organic compounds role and interests, pages 44-57
- **National Committee for Clinical Laboratory Standards., 2000.** Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 5 th editionvolume 17. Approved standards-M7-A4. NCCLS document M7-A4. National

Committee for Clinical Laboratory Standards Wayne Pa. NCTC 6749 contributes to its tolerance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*.

- **Ngassapa, O., Runyoro, D. K. B., Harvala, E., & Chinou, I. B., 2003.** Composition
- **Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., & Lacroix, M., 2006.** Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat Science*, 73(2), 236-244.
- **Oussou K.R., Youlou S., Kanko C., Guessennnd K. N., Boti J.B., Ahibo C. & Casanova J., 2008.** Etude chimique et activité antidiarrhéique des huiles essentielles de deux plantes aromatiques de la pharmacopée Ivoirienne. *European Journal of Scientific Reaserch*. 1: 94-103.
- **Oussou K.R., Youlou S., Kanko C., Tue Bi B., Kanko C., Boti J.B., Ahibo C. & Casanova J., 2010.** Etude Chimique Bio-Guidée de L'huile Essentielle de *Ocimumgratissimum* (Lamiaceae). *European Journal of Scientific Reaserch*. 1: 50-59.
- **Bonneval P. et Dubus F., 2014.** Manuel pratique d'aromathérapie au quotidien. Editions Désiris ; Paris.
- **Panizzi L., Flamini G., Cioni PL., Morelli I., 1993.** Composition and antimicrobial properties of essential oils of four Mediterranean Lamiaceae. *J. Ethnopharmacol.* 39: 167-170., sur *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *E-coli* ATCC25922 ont donné des valeurs de
- **Paris R. & Godon M., 1979.** Chromatographie en couche mince et sur papier des huiles essentielles. Ed. Masson, Paris.
- **Pibiri M.C., 2006.** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. thèse de Doctorat, Lausanne, Canada, p :177.
- **Piochon M., 2008.** *Étude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore laurentienne : composition chimique, activités pharmacologiques et hémi-synthèse.* Mémoire pour la maîtrise en ressources renouvelables. Université du Québec à Chicoutimi.
- **Porter N.** Essential oils and their production. *Crop & Food Research*. Number 39(2001).
- **Rodrigues F.F.G., Costa J.G.M. & Coutinho H.D.M., 2009.** Synergy effects of the antibiotics gentamicin and the essential oil of *Croton zehntneri*. *Phytomedicine*, 16:1052–1055.

- **Rosato A., Vitali C., De Laurentis N., Armenise D. & Milillo M.A., 2007.**Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin. *Phytomedicine* **14** : 727-732.
- **Roux D.,** 2011, Conseil en aromathérapie. 2e éd. Pays-Bas : Pro-Officina, 187 pages.
- **Roux D.et Catier O., 2007.**Botanique, pharmacognosie :Wolters Kluwer France, 1946
- **Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., Bruni, R.,2005.** Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chem.*, 91: 621-632.
- **Saint Laumer D.J.Y., Frérot E. & Herrmann A., 2003.** Controlled release of perfumery alcohols by neighboring-group participation. Comparison of the rate constants for the alkaline hydrolysis of 2-acyl-, 2-(hydroxymethyl)-, and 2-carbamoylbenzoates; *Helvetica Chimica Acta* **86**: 2871-2899.
- **Sangwan N.S., Farooqi A.H.A., Shabih F., Sangwan R.S.** Regulation of essential oil
- **Satrija, F., Nansen, P., Murtini, S., & He, S.,1995.** Anthelmintic activity of papaya latex against patent *Heligmosomoides polygyrus* infections in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 48, 161-164
- **Skaria B.P. et al., 2007.**Aromatic Plants, Ed: New India Publishing Agency, p: 37-43.
- **Skoog D.A., Holler F.J. & Niemen T.A., 2003.** Principes d'analyse instrumentale. 1^{ère} édition, Ed. De Boeck Université: 945.
- **Thiago S.A., João B.T.R., Fabíola F.G.R., Adriana R.C. & José G.M.C.,**
- **Tranchant J., 1995** . Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. Ed. Masson. Paris.tree oil). *Letters in Applied Microbiology*, **30**: 294-297.
- **V. A. Worwood., 2002.** Aromathérapie pour l'esthéticienne. Editions Vigot ; Paris.
- **Velé H., 2015,** Thèse pour le diplôme d'État de Docteur en Pharmacie, Valorisation officinale des huiles essentielles autorisées dans les phytomédicaments, Université Angers.
- **Wang W.,Wu N.,Zu YG.,Fu YJ.,2008.**Antioxidant Activity of *Rosmarinus officinalis* L.oil compared to its main compounds.*Food chem.*.108(3):1019-1022.
- **Yoon, H. S., Moon, S. C., Kim, N. D., Park, B. S., Jeong, M. H., & Yoo, Y. H.** (2000). Genistein induces apoptosis of RPE-J cells by opening mitochondrial PTP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 276, 151-156.
- <http://www.directionnature.com/index.php/approches-complementaires/aromatherapie>

- <https://revelessence.com/huile/pin-sylvestre/>
- <https://www.aroma-zone.com/info/fiche-technique/huile-essentielle-pin-sylvestre-aroma-zone?page=library>
- <https://www.passeportsante.net/fr/Solutions/HuilesEssentielles/Fiche.aspx?doc=huile-essentielle-lavande-fine>
- <https://www.passeportsante.net/fr/Solutions/PlantesSupplements/Fiche.aspx?doc=lavande ps>
- <https://www.naturactive.fr/reponses-sante-naturelles/aromatherapie/huile-essentielle-bio/Lavande-fine-huile-essentielle-bio>
- www.lavieestbelleaunaturel.com
- https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/105297/tab/taxo
- https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/113703/tab/taxo



Annexes

Annexes

Composition des solutions et milieux de culture utilisés

- **Gélose nutritive**

La gélose nutritive ou gélose nutritive ordinaire (GNO) ou encore gélose ordinaire est un milieu d'isolement non-sélectif.

Composition en g/l

- Extrait de viande : 1,0g/L
- Extrait de levure : 2,5g/L
- Peptone : 5,0g/L
- Chlorure de sodium : 5,0 g/L
- Agar : 15,0 g/L
- pH : 7,0

- **Milieu MH**

La gélose Mueller-Hinton est une gélose riche pour la réalisation de l'antibiogramme standard

Composition en g/l

- ✓ Infusion de viande de bœuf : 300,0 ml
- ✓ Peptone de caséine : 17,5 g
- ✓ Amidon de maïs : 1,5 g
- ✓ Agar : 17,0 g
- ✓ pH = 7,4

- **Milieu BHIB** BD Brain Heart Infusion (BHI)

Composition en g/l

- 8,0 g Digestion peptique de tissu animal
- 5,0 Digestion pancréatique de caséine
- 16,0 Chlorure de sodium
- 5,0 Glucose 2,0 Phosphate d'hydrogène disodique 2,5 Gélose 13,5
- Ph $7,4 \pm 0.2$

Résumé

Les huiles essentielles ont un spectre d'action biocide très large puisqu'elles inhibent la croissance de moisissures, levures et bactéries. Le but de ce travail est de déterminer l'activité antibactérienne de deux huiles essentielles *Lavandula angustifolia* Mill et *Pinus Sylvestris* L, testées seules et en combinaison avec différentes concentrations.

L'activité inhibitrice a été évaluée sur des bactéries à Gram négatif et à Gram positif en suivant deux méthodes : en milieu gélosé : aromatoگرامme, et en milieux liquide : Microdilution. Un bon nombre de bactéries ont montré une sensibilité importante vis-à-vis de ces huiles avec des diamètres différents. En milieu gélosé, *Lavandula angustifolia* Mill est plus efficace que *Pinus sylvestris* L sur la plupart des bactéries testées. En milieu liquide une CMI a été révélée uniquement pour *Escherichia coli* avec une concentration de 31.77µl/ml.

L'utilisation des huiles essentielles est donc proposée comme bactéricide afin de limiter l'utilisation des antibiotiques.

Mots clés : huile essentielle, Lavande fine, Pin sylvestre, aromatoگرامme, microdilution, activité antimicrobienne, microorganismes.

Abstract

Essential oils have a broad spectrum of biocidal action since they inhibit the growth of molds, yeasts and bacteria. The aim of this work is to determine the antibacterial activity of two essential oils *Lavandula angustifolia* Mill and *Pinus Sylvestris* L, tested alone and in combination with different concentrations.

The inhibitory activity was evaluated on Gram-negative and Gram-positive bacteria by two methods: in agar medium: aromatoگرام, and in liquid medium: microdilution. A good number of bacteria have mounted a high sensitivity to these oils with different diameters. In agar medium, *Lavandula angustifolia* Mill is more effective than *Pinus sylvestris* L on most bacteria tested. In liquid medium a MIC was revealed only for *Escherichia coli* with a concentration of 31.77µl / ml.

The use of essential oils is therefore proposed as a bactericide to limit the use of antibiotics.

Key words: essential oil, fine lavender, Scots pine, aromatoگرام, microdilution, antimicrobial activity, microorganisms.