

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**Université Mouloud MAMMERY de Tizi-Ouzou**



**Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques**

Mémoire de fin de cycle en vue de l'obtention du Diplôme de  
Master en sciences agronomiques  
**Option: Transformation et Conservation des Produits Agricoles**

**Thème**

**Évaluation de l'activité antibactérienne de composés  
d'origine végétale, microbienne et synthétique testés  
individuellement et en combinaison.**

Travail réalisé par :

**M<sup>lle</sup> ABDI Fatima et M<sup>lle</sup> ARKAM Roza**

Soutenu devant le jury:

Président : **Mr AMIR Youcef, Professeur, UMMTO**

Examineur 1: **Mr SADOUDI Rabah, Maître de conférences, UMMTO**

Examineur 2: **Mme HELLAL Zohra, Maître assistante, chargée de cours, UMMTO**

Promoteur : **M<sup>r</sup> AMROUCHE Tahar, Maître de conférences, UMMTO**

Co-promoteur : **Mr LIBDIRI Farid, Maître assistant, chargé de cours, Université de Bouira**

**Promotion : 2015 - 2016**

*Ce sujet nous a été proposé par notre encadreur AMROUCHE TAHAR, Maître de conférences à l'UMMTO, nous lui adressons nos sincères remerciements pour ses conseils judicieux, son jugement critique et son appui tout au long de cette étude. On a eu le privilège de bénéficier de son enseignement, son savoir et de son expérience, alliés à ses qualités humaines resteront pour nous un modèle. Ce travail est un témoignage de notre profonde gratitude.*

*Nos reconnaissances vont également à Mademoiselle LAMMI SARAH chargée de cours à l'UMMTO pour sa modestie et gentillesse son aide et sa disponibilité, merci.*

*Nous remercions vivement les membres de ce jury:*

*Monsieur le Président du jury, AMIR YUCEF, Maître de conférences à l'UMMTO, Nous sommes très honorées que vous ayez accepté la présidence du jury de ce mémoire. Trouvez ici l'expression de nos sincères remerciements et soyez assuré de notre profonde gratitude.*

*Monsieur SADOUDI RABAH, Maître de conférences à l'UMMTO, merci d'avoir accepté de faire partie du jury, et pour le temps d'avoir consacré à évaluer notre travail. Madame HELLAL Zohra, Maître assistante à l'UMMTO, Merci d'avoir accepté de faire partie du jury de ce mémoire, pour l'intérêt que vous portez à notre travail et pour le temps consacré afin de l'évaluer.*

*Nos vifs remerciements s'adressent à monsieur Libdidi Farid, Maître assistant à l'université de Bouira pour nous avoir fournis quelques échantillons à tester pour notre étude ainsi que d'avoir guidé notre travail. Merci.*

*Nous remercions également les techniciennes du laboratoire de microbiologie du d'Agronomie et du laboratoire commun de microbiologie du département biologie de l'UMMTO pour leur aide précieuse. Nous remercions également tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail directement ou indirectement, de près ou de loin.*

*Merci à nos familles qui nous ont soutenues et aidées à surmonter toute difficulté.*

- ADN** : Acide ribonucléique
- ATCC**: American type culture collection
- ATP** : Adénosine triphosphate.
- CMB** : Concentration Minimale Bactéricide.
- CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice.
- DMSO** : Di-Méthyl-Sulfoxyde.
- CPs** : Composés phénoliques
- EFSA** : European Food Safety Authority
- FDA** : Food and Drug Administration
- FFC** : Food Chemical Codex
- MH** : Mueller Hinton.
- HEA** : Huile essentielle de l'ail
- HEG** : Huile essentielle de clou de girofle
- HEE** : Huile essentielle d'eucalyptus
- HES** : Huile essentielle de la sauge
- HET** : Huile essentielle de thym
- MRSA** : Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*
- pH** : Potentiel d'Hydrogène
- UFC** : Unité Formant Colonie
- VRE** : Vancomicine resistant enterobacillus.

|  |    |
|--|----|
| <b>Figure 1:</b> Morphologie générale de la plante <i>Thymus vulgaris</i> .....  | 6  |
| <b>Figure 2:</b> Morphologie générale de la plante <i>Salvia officinalis</i> .....   | 7  |
| <b>Figure3:</b> Morphologie générale de la plante d'ail.....   | 8  |
| <b>Figure 4 :</b> Bourgeons floraux du giroflier qui, séchés, donnent les clous de girofle. ....                                   | 10 |
| <b>Figure 5:</b> Morphologie générale de la plante d'eucalyptus.....   | 12 |
| <b>Figure 6:</b> Mode d'action antimicrobienne des huiles essentielles.....  | 15 |
| <b>Figure 7:</b> Mode d'action antimicrobienne des acides organiques.....  | 20 |
| <b>Figure 8:</b> Résultats de la coloration de Gram.....   | 36 |
| <b>Figure 9:</b> Effet du DMSO et de l'eau physiologique stérile sur quelques bactéries<br>Etudiées .....                          | 37 |
| <b>Figure 10:</b> Résultats du témoin négatif pour la méthode des puits .....  | 37 |
| <b>Figure 11:</b> Représentation graphique des résultats de l'antibiogramme effectué sur les<br>souches bactériennes choisies..... | 38 |
| <b>Figure 12:</b> Représentation graphique des résultats de la méthode des puits sur les souches<br>Testées .....                  | 39 |
| <b>Figure 13 :</b> Effet inhibiteur de la de la méthode des puits.....   | 42 |
| <b>Figure 14 :</b> Photos illustrant l'effet inhibiteur de la combinaison : Acide lactique avec l'HE<br>de thym .....              | 45 |
| <b>Figure 15:</b> Photos illustrant l'effet inhibiteur de la combinaison de l'acide lactique avec l'HE<br>d'eucalyptus.....        | 48 |
| <b>Figure 16:</b> Photos illustrant l'effet inhibiteur de la combinaison de l HE de thym avec l'HE<br>d'eucalyptus.....            | 51 |
| <b>Figure 17:</b> Photos illustrant l'effet de la combinaison de l'HE de thym avec l'HE de la sauge<br>.....                       | 53 |
| <b>Figure 18:</b> Photos illustrant l'effet inhibiteur de la combinaison : HE de thym avec le<br>complexe chimique.....            | 54 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Tableau I</b> : Structure de quelques composés phénoliques .....   | 13 |
| <b>Tableau II:</b> Etat descriptif des souches bactériennes utilisées.....  | 29 |
| <b>Tableau III:</b> Présentation des différentes combinaisons effectuées .....  | 34 |
| <b>Tableau IV</b> : CMI des souches bactériennes exprimées en % pourcentage .....   | 43 |
| <b>Tableau V</b> : Nature de l'activité antimicrobienne des différents agents antimicrobiens testés<br>après repiquage sur le milieu MH ..... | 44 |
| <b>Tableau VI:</b> Résultats du test de combinaison : Acide lactique versus HE de thym.....   | 45 |
| <b>Tableau VII:</b> Résultats du test de combinaison : Acide lactique versus HE d'eucalyptus.....   | 46 |
| <b>Tableau VIII:</b> Résultats du test de combinaison : Acide lactique versus HE de la sauge.....   | 48 |
| <b>Tableau IX:</b> Résultats du test de combinaison : HE de thym versus HE d'eucalyptus .....   | 50 |
| <b>Tableau X:</b> Résultats du test de combinaison : HE de thym avec l'HE de la sauge.....  | 51 |
| <b>Tableau XI</b> : Résultats du test de combinaison :HE de thym avec le complexe biochimique à<br>base d'uracile.....                        | 53 |

|                            |   |
|----------------------------|---|
| Liste des tableaux         |   |
| Liste des figures          |   |
| Liste des abréviations     |   |
| Introduction générale..... | 1 |

## Première partie : Synthèse bibliographique

### Chapitre I : Les métabolites d'origine végétale

|  |    |
|--|----|
| I.1. Les huiles essentielles .....                       | 3  |
| I.1.1. <i>Thymus vulgaris</i> .....                      | 6  |
| I.1.2. <i>Salvia officinalis</i> .....                   | 7  |
| I.1.3. <i>Allium</i> .....                               | 8  |
| I.1.4. <i>Syzygium</i> .....                             | 10 |
| I.1.5. <i>Eucalyptus</i> .....                           | 12 |
| I.2. Autres métabolites végétaux.....                    | 13 |
| I.2.1. Les composés phénoliques .....                    | 13 |
| I.2.2. Les alcaloïdes.....                               | 13 |
| I.3. Mécanisme d'action.....                             | 15 |
| I.3.1. Mécanisme d'action des huiles essentielles.....   | 15 |
| I.3.2. Mécanisme d'action des composés phénoliques ..... | 16 |
| I.3.3. Mécanisme d'action des alcaloïdes .....           | 16 |

### Chapitre II : Les métabolites d'origine microbienne

|  |    |
|--|----|
| II.1 .Les bactériocines .....                | 17 |
| II.1.1. Généralités.....                     | 17 |
| II.1.2. Application des bactériocines .....  | 18 |
| II.2. L'acide lactique .....                 | 18 |
| II.2.1. Généralités.....                     | 18 |
| II.2.2. Application de l'acide lactique..... | 18 |
| II.3. Les antibiotiques.....                 | 19 |
| II.4. Mécanisme d'action .....               | 19 |

|  |    |
|--|----|
| II.4.1. Mécanisme d'action des bactériocines .....   | 19 |
| II.4.2. Mécanisme d'action de l'acide lactique ..... | 20 |
| II.4.3. Mécanisme d'action des antibiotiques .....   | 20 |

## **Chapitre III : Les métabolites d'origine synthétique**

|                                     |    |
|-------------------------------------|----|
| III.1. Les complexes chimiques..... | 21 |
| III.2. Mécanisme d'action .....     | 22 |

## **Chapitre IV : Interactions entre les agents antimicrobiens**

|  |    |
|--|----|
| IV.1. Action combinée des agents antimicrobiens .....            | 24 |
| IV.2. Comparaison entre les agents antimicrobiens .....          | 24 |
| IV.2.1. Huiles essentielles versus antibiotiques .....           | 25 |
| IV.2.2. Bactériocines versus antibiotiques .....                 | 26 |
| IV.2.3. Combinaison des bactériocines avec d'autres agents ..... | 27 |

## **Deuxième partie : Etude expérimentale**

### **Chapitre I : Matériel et méthodes**

|   |    |
|---|----|
| I. Matériel biologique .....  | 28 |
| II. Vérification des souches microbiennes .....                                 | 31 |
| III. Evaluation qualitative et quantitative de l'activité antibactérienne ..... | 32 |
| IV. Détermination des CMI et CMB .....  | 33 |
| V. Combinaisons des agents antimicrobiens .....                                 | 34 |

### **Chapitre II : Résultats et discussions**

|   |    |
|---|----|
| I. Criblage des substances antimicrobiennes (screening).....    | 36 |
| II. Concentrations minimales inhibitrices et bactéricides ..... | 43 |
| III. Effets des combinaisons des substances étudiées.....       | 44 |
| Conclusion et perspectives .....                                | 55 |

Références bibliographiques.

Annexes.

# *Introduction*

De nos jours, l'ajout d'agents antimicrobiens, notamment ceux d'origine synthétique, dans les aliments en vue de prolonger leur durée de vie, suscite un large débat aussi bien chez les consommateurs que chez les industriels de l'agro alimentaire. Le débat médiatisé est surtout focalisé sur les effets secondaires (négatifs) éventuels des agents antimicrobiens sur la santé du consommateur et les possibilités de leur remplacement par des agents naturels extraits de végétaux, de microorganismes ou d'animaux.

La recherche de nouvelles molécules bioactives alternatives (sans effets indésirables) est d'autant plus soutenue que la résistance bactérienne aux antimicrobiens est de plus en plus préoccupante en raison de la fréquence avec laquelle de nouveaux phénotypes de résistance apparaissent parmi les agents pathogènes et même chez les microorganismes commensaux.

En dépit de tout l'arsenal d'antibiotiques utilisés, les substances chimiques antimicrobiennes qui peuvent agir efficacement sur les cellules eucaryotes, comme les levures, ne sont pas disponibles (Xianghong *et al.*, 2007). Aussi, l'évolution des esprits et le refus du "tout chimique" par les consommateurs sont manifestés et ouvrent la porte au "retour du naturel".

Les huiles essentielles (métabolites secondaires d'origine végétale) constituent une source intéressante de nouveaux composés bioactifs et se présentent comme les meilleurs candidats dans la recherche des alternatives. Cependant, l'application de ces huiles comme substances antimicrobiennes dans les aliments est souvent découragée en raison de la perte potentielle d'action antimicrobienne due à leur volatilité, lipophilicité ainsi que la persistance de leurs arômes (Bagamboula *et al.*, 2004).

Pour remédier à ces inconvénients, l'utilisation de combinaisons de molécules bioactives naturelles à pouvoir antimicrobien, pourrait être prometteuse et envisageable en industrie agro-alimentaire dans la mesure où elle permet d'optimiser leurs effets antimicrobiens tout en limitant leurs effets secondaires.

En effet, des travaux antérieurs ont démontré l'effet combiné létal de plusieurs agents antimicrobiens sur des espèces microbiennes. Récemment, une étude de Ousslimani et Tafer (2015) a mis en évidence un effet inhibiteur combiné de l'association de l'huile essentielle de thym et de l'acide citrique sur *E. coli*, *B. cereus* et *C. albicans*. De même, Horvath *et al.* (2016) ont démontré l'effet synergique de la combinaison des huiles essentielles de thym, de la cannelle, du clou de girofle et de la menthe verte contre les levures et les moisissures, leurs doses ont été réduite dans ces associations.

En outre, des complexes chimiques à base de métaux de transition (nickel, cuivre...) et de composés organiques (acides aminés, bases nucléotidiques) non toxiques pour l'homme font actuellement objet de nombreuses recherches scientifiques visant à démontrer leurs activités antimicrobiennes (Popova *et al.*, 2012; Miloš *et al.*, 2014; Kumara *et al.*, 2015).

Le présent travail a pour objectif d'une part, d'évaluer et de comparer *in vitro* l'activité antibactérienne de cinq huiles essentielles issues de thym, de l'ail, de clou de girofle, de la sauge et d'eucalyptus (métabolites végétaux) versus l'acide lactique (métabolite bactérien) et

d'autre part, déterminer l'interaction entre ces substances et un complexe chimique à base d'uracile via des combinaisons. Le mémoire comprend une synthèse bibliographique et une partie pratique présentant la méthodologie de travail adoptée et les résultats obtenus.



*Chapitre I :*  
*Les métabolites d'origine végétale*

Le métabolisme des végétaux produit des composés dits métabolites. Parmi ces derniers certains d'entre eux sont considérés non indispensables, il s'agit des métabolites secondaires. A titre d'exemple, les huiles essentielles, les composés phénoliques ainsi que les alcaloïdes. Cependant, ils jouent un rôle dans la défense de la plante contre les nuisibles. Il est bien établi que certains métabolites d'origine végétale présentent un pouvoir antimicrobien dépendant du métabolite produit (Haddouchi et Benmansour, 2008).

## I.1. Les huiles essentielles

### • Généralités

Le terme « huile » s'explique par la propriété de solubilité dans les graisses et par leur caractère hydrophobe. Le terme « essentielle » fait référence au parfum, à l'odeur dégagée par les plantes (Teusher et *al.*, 2005). Elles ont reçu le nom « huiles essentielles » en raison de leur aspect huileux et du parfum qu'elles dégagent (Bachelot et *al.*, 2006).

Dans le règne végétal les huiles essentielles se retrouvent généralement chez les végétaux supérieurs plus exactement chez les genres capables d'élaborer les constituants qui les composent. Elles sont stockées à l'intérieur d'un ou de plusieurs organes, sur le plan quantitatif les teneurs en huiles essentielles des plantes pouvant les contenir sont très faibles (Mann., 1987).

Ce sont des substances odorantes liquides, volatiles à température ambiante solubles dans les solvants organiques et peu solubles dans l'eau (Baudoux., 2000). Elles sont produites naturellement par des plantes dites aromatiques considérées comme étant élément de base dans le domaine de l'aromathérapie et sont utilisées dans l'industrie des cosmétiques de parfumerie et en agro-alimentaire dont le but d'apporter des saveurs et des arômes. Leur qualité odorante leur permet d'autres applications importantes en médecine voir leur efficacité physiologique et le soulagement des douleurs (Bakkali et al, 2008).

D'après l'agence nationale de sécurité des médicaments (ANSM) et la norme (AFNOR/ISO, 2005-2006) les huiles essentielles sont définies comme suit :

« Produit odorant, généralement de composition complexe, obtenue à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par hydro-distillation , soit par distillation sèche ou par procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est la plus souvent préparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition. »

Elles ont des propriétés et des modes d'utilisation particuliers et ont donné naissance d'une branche nouvelle de la phytothérapie : l'aromathérapie voir ses multiples composants. Elles sont constitués principalement de deux groupes de composés odorants, il s'agit des terpènes prépondérants dans la plupart des essences et des composés aromatique dérivés du phénylpropane (Kurkin., 2003). Cette diversité moléculaire confère aux HE des rôles et des propriétés biologiques très variés et leur efficacité est liée à leur composition en substances actives (composés phytochimiques), aux groupements fonctionnels (alcools, phénols, cétones) (Zhiri, 2006) et leurs effets synergiques, d'un autre terme sa valeur tient à son ensemble; c'est-à-dire, l'intégralité de ses constituants et non seulement à ses constituants et non seulement à ses composés majoritaires (Lahlou, 2004).

-activité préventive (indirecte): les antioxydants bloquent l'initiation en complexant les catalyseurs, en réagissant avec l'oxygène, ou des agents de terminaison capables de piéger les

radicaux libres, ils forment ainsi des produits finis non radicalaires (Berser et Cervelier, 1996).

- **Application des huiles essentielles**

Les HEs sont utilisées dans le domaine de parfumerie et cosmétique, en agro-alimentaire, ainsi dans le domaine pharmaceutique et en médecine (Grysole, 2004).

- Le domaine alimentaire

En industrie alimentaire on vise toujours une meilleure conservation saine et à longue durée pour les produits et l'amélioration de la qualité organoleptique pour cela de nouvelles techniques ont été mises en évidence basées sur l'utilisation des huiles essentielles (Lis-Balchin et *al.*, 1998).

Elles peuvent être ajoutées à tous les aliments comme : les viandes, les volailles, les charcuteries et les légumes vu leur propriétés antimicrobiennes et antioxydantes (Conner, 1993 ; Hammer et *al.*, 2011).

Leur addition a pour but de rehausser le goût et empêcher le développement des contaminants alimentaires microbiens (Bilgrami et *al.*, 1992).

Les HEs de *citrus limon* servent à la fabrication d'essences fruitées et d'arômes de boissons, de liqueurs, de pâtisserie et de confiseries (Choi et *al.*, 2000), celles de menthe pour les yaourts, celles de thym, de noix de muscade ou de gingembre pour les céréales (Degryse et *al.*, 2008).

Les plats cuisinés utilisent les plantes aromatiques sous toutes leurs formes: oléorésines et huiles essentielles mais aussi sous formes fraîche, sèche ou surgelée (Onippam, 1997).

D'après Hellal (2011), les HEs de *C.aurantium* peuvent servir comme agents naturels dans la préservation des produits de la pêche.

- Le domaine pharmaceutique

Etant formées de mélanges très complexes, les huiles essentielles présentent des propriétés thérapeutiques ce qui leur permet d'entrer dans la fabrication des produits pharmaceutiques (Turgeon, 2001).

Elle utilise des isolats (substances pures isolées des huiles essentielles), comme matière première pour la synthèse de principes actifs médicamenteux, de vitamines, de substances odorantes, etc. A titre d'exemple nous pouvons citer l'exploitation industrielle des pinènes à partir de l'essence de térébenthine et de l'eugénol à partir de l'essence de giroflier (Adams, 1989).

L'industrie pharmaceutique utilise les huiles essentielles dans le domaine des antiseptiques externes; elle tire partie des propriétés bactériostatiques, bactéricides, antifongiques, protectrices, etc., des essences naturelles. A titre d'exemple, l'huile essentielle d'eucalyptus est largement utilisée en pharmacie pour ses propriétés anti infectieuses, cicatrisantes, et pour la réparation des tissus. L'eucalyptol, l'un des principaux constituants de certaines huiles essentielles d'eucalyptus, est utilisé dans les préparations pharmaceutiques où il joue le rôle d'antiseptique, dans le traitement des inflammations du nez et de la gorge (Bouquet.A, 1972).

- Parfumerie et cosmétologie

Dans la réalisation des transformations dans la parfumerie, on utilise à côté des constituants issus de la synthèse chimique, des extraits naturels sélectionnés pour leurs qualités olfactives jugées irremplaçables pour leur originalité ou leur puissance. A titre d'exemple, l'essence de vétiver, grâce à son odeur agréable, est recherchée en cosmétologie et en parfumerie haut de gamme associée à d'autres essences telles que le santal, le patchouli ou la rose pour lesquelles elle joue le rôle de fixateur naturel. L'huile essentielle d'ylang-ylang est très employée en cosmétologie, en parfumerie et en savonnerie de luxe. Les huiles essentielles servent aussi en hygiène, en esthétique corporelle sous forme de lotions, d'eaux florales, de crèmes, de gels, de pommades, etc.. (Jouhaneaud.G, 1991).

Les pinènes constituent un produit industriel de première importance, leur réactivité marquée autorisant la synthèse de très nombreux produits. Parmi les principales voies synthétiques mises en oeuvre, il y a les réactions de pyrolyse: la thermolyse du seul bêta-pinène conduit, via des réactions radicalaires, à des carbures tels que le myrcène qui est lui-même une matière première permettant d'accéder à un grand nombre de composés intéressant la parfumerie (via les chlorures de géranyle et de néryle) (Adams, 1989).

### **I.1.1. *Thymus vulgaris***

#### **I.1.1.1. Généralités**

*Thymus* nom dérivant du mot grec « *thymos* » et signifie « parfumer » par rapport à son odeur agréable dégagée (Pariente, 2005). Comme tous les genres des labiées, l'espèce *Thymus vulgaris* est connue pour son huile essentielle présentant une qualité aromatique et des propriétés médicinales, localement connue sous le nom « Zaatar » (Yakhlef, 2005) et « thyme » en anglais (Amiot, 2005).

#### **I.1.1.2. Classification botanique de la plante**

Règne : Plantae

Sous-règne : Tracheobionta

Embranchement : Magnoliophyta

Sous-embranchement : Agnoliophytina

Classe : Magnoliopsida

Sous-classe : Asteridae

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiaceae

Genre : *Thymus*

Espèce : *Thymus vulgaris*

### I.1.1.3. Description botanique de la plante



**Figure 1 : Morphologie générale de la plante *Thymus vulgaris***

*Thymus vulgaris* sous arbrisseau, vivace, touffu et très aromatique de 30-40 cm de hauteur, d'un aspect grisâtre ou vert grisâtre. Ces tiges ligneuses et très rameuses sont regroupées en buisson très dense. Ses feuilles sont très petites, ovales, au pétiole extrêmement court et blanchâtres à leur face inférieure. Ses fleurs sont presque roses ou presque blanches, font de 4 à 6 mm de longueur, sont pédicellées et réunies ordinairement au nombre de trois à l'aisselle des feuilles supérieures (Bruneton, 1999).

### I.1.1.4. Composition chimique de l'huile essentielle de thym

La teneur en huile essentielle varie de 5 à 25 ml/Kg, les feuilles contiennent 0.5 à 2.5% d'huile essentielle dont la composition varie selon les conditions climatiques (Bruneton, 1999).

Le thymol est le constituant majeur de l'huile essentielle de thym, il s'agit d'un phénol de formule  $C_{10}H_{14}O$  qui est un isomère du carvacrol, il se trouve aussi d'autres hydrocarbures d'une grande volatilité comme le cymène et le thymène (PAULI et al., 1987).

Trente composés ont été identifiés en utilisant la chromatographie en phase gazeuse, les plus abondants sont : Thymol (44.4-58%), p-cymène (9.1-18.5%),  $\gamma$ -terpinène (6.9-18.5%), carvacrol (2.4-4.2%), linalol (4-6.2%) (Bazytko et Strzelecka, 2007).

### I.1.1.5. Application de l'huile de thym

Le thym est originaire des régions méditerranéennes, à l'ouest de l'Europe et aux États-Unis, son huile essentielle est utilisée dans le mode entier pour ses vastes applications dans le domaine alimentaire, pharmaceutique, cosmétique et la médecine traditionnelle (Adwan et al., 2009). Il est cultivé pour l'usage culinaire dans l'assaisonnement des poissons, volailles, des potages et des légumes (Ozcan et Chalchat, 2004).

En plus de l'utilisation traditionnelle des extraits aqueux de la plante *Thymus vulgaris* et son huile essentielle, leur composition en thymol et carvacrol leur confèrent une application industrielle (comme additif alimentaire) et médicinale (Hudaib et al., 2002).

Les feuilles de thym sont utilisées comme traitement symptomatique des troubles digestifs, de la toux et la bronchite par voie orale (Bruneton, 1999).

## I.1.2. *Salvia officinalis*

### I.1.2.1. Généralités

Plusieurs appellations ont été données à la sauge. Selon Ibn El Beytar, les andalous la nomment "essalma" qui ajoute qu'elle est appelée "salbia" par les botanistes en Espagne. El djazairi indique l'expression "souek ennebi" comme synonyme de Saleme.

### I.1.2.2. Classification botanique de la plante

Règne : Plantae  
Sous-règne : Tracheobionta  
Embranchement : Magnoliophyta  
Sous-embranchement : Agnoliophytina  
Classe : Magnoliopsida  
Sous-classe : Asteridae  
Ordre : Lamiales  
Famille : Lamiaceae  
Genre : *Salvia*  
Espèce : *Salvia officinalis*

### I.1.2.3. Description botanique de la plante

*Salvia* est une plante annuelle et biennale d'origine méditerranéenne de la famille des labiées (Djerroumi, Nacef 2004). Il existe environ 900 espèces identifiées autour du monde (Maksinovic *et al* 2007 ; Longaray *et al* 2007).

La sauge est un arbrisseau buissonnant formant une touffe pouvant atteindre 80cm de hauteur. Ses feuilles sont opposées de couleur grisâtre, les bords de limbe crénelés. Les fleurs sont de couleur bleu violacée regroupées par 3 à 5 petites grappes, les fruits sont des tétrakènes sphériques (Teurcher ,2005).



Figure03: Morphologie générale de la plante *Salvia officinalis*

### I.1.2.4. Composition chimique de l'huile essentielle de la sauge

Les principales molécules contenues dans l'huile essentielle, qui donnent à la sauge son odeur typique, sont les thuyones (α-thuyone 18-43% et β-thuyone 3-8,5%), qui peuvent

représenter jusqu'au 50% de la composition chimique de l'huile essentielle et le camphre (4,5-24,5%) (Catizone *et al.*, 1986).

### **I.1.2.5. Application de l'huile essentielle de la sauge**

L'huile essentielle de sauge est très utilisée, vu ses propriétés importantes; elle est considérée comme un stimulant pour les gens anémiques, aussi pour les personnes stressées et déprimées. Pour usage externe, elle est appliquée contre les inflammations de la bouche, les abcès, et aussi pour le nettoyage et la cicatrisation des plaies (Djerroumi et Nacef 2004). Les infusions de la sauge sont appliquées pour le traitement de plusieurs maladies de la circulation sanguine et les troubles digestifs et les problèmes du système nerveux (Radulescu *et al* 2004). Cette herbe aromatique est employée dans la cuisine, pour son goût puissant, légèrement amer et comphré (Duling 2007).

### **I.1.3. *Allium***

#### **I.1.3.1. Généralités**

L'ail est originaire d'Asie centrale. Il dérive de l'espèce asiatique *Allium longicuspus*. On a retrouvé des gousses d'ail en argile datant de 3750 JC. Il était largement cultivé en Egypte. Les Grecs l'appelaient "rose puante" Le nom commun "ail" et le nom botanique "*Allium*", vient du mot celtique "All" qui signifie "qui brûle" (Block 1992).

#### **I.1.3.2. Classification botanique de la plante**

Règne : *Plantae*

Sous-règne : *Tracheobionta*

Embranchement : *Magnoliophyta*

Sous-embranchement : *Agnoliophytina*

Classe : Monocotyledonae

Sous classe : Liliidae

Ordre : Liliales

Famille : Liliaceae

Genre : *Allium*

#### **I.1.3.3. Description de la plante**



**Figure 03: Morphologie générale de la plante de l'ail**

L'ail est une plante monocotylédone vivace herbacée, bulbeuse assez grande à nombreuse feuilles engainant le bas de la tige. Elle mesure 30 à 120 cm de hauteur,

l'inflorescence est enveloppée d'une spathe en une seule pièce tombant assez rapidement, les fleurs sont groupées en ombrelles, assez peu nombreuses elles sont de couleur blanche ou rose et s'épanouissent en été. Le fruit est une capsule à trois loges mais celle-ci est rarement produite. La racine à bulbe est composée de 3 à 20 bulbes clous arqués (les caïeux) (Bruneton 1999).

#### **I.1.3.4. Composition chimique de l'huile essentielle de l'ail**

De tous les composants de l'huile essentielle de l'ail, l'allicine est la plus abondante qui est une molécule transitoire qui se forme à partir de l'alliine. L'allicine formée est un antibiotique naturel (Abramovitz et *al.*, 1999). D'autres composés semblent aussi avoir des propriétés médicinales tels que l'ajoéne, les polyphénols, les saponines...

La gousse d'ail contient des polysaccharides de réserves (Fructanes), des acides aminés, des enzymes (l'alliinase, la peroxydase et la catalase) ainsi que des composés soufrés responsables de la majorité de ses propriétés thérapeutiques. Cette huile est riche en éléments minéraux: P, K, S, Zn, Ca, Cu, Mg et en oligo-éléments comme le sélénium et le germanium. Elle renferme aussi des vitamines A, B1, B2, PP et C et des acides gras essentiels. D'autres composants sont également identifiés, parmi lesquels : les saponines ( $\beta$ -chlorogénine), les pigments phénoliques, les terpénoïdes, les antibiotiques et les antioxydants (Miean et *al.*, 2001; Gorinstein et *al.*, 2005; Leelarumgrayub et *al.*, 2006).

#### **I.1.3. 5. Application de l'huile essentielle de l'ail**

Elle est utilisée depuis plusieurs centaines d'années pour traiter divers problèmes de santé. Un très grand nombre d'études ont été réalisées afin de mieux connaître ses principes actifs et leurs effets. En effet elle sert depuis longtemps pour réduire le cholestérol et les triglycérides et elle est indiquée aussi pour les personnes souffrant de diabète à cause de ses propriétés hypoglycémiques. De plus, il a été démontré que la consommation d'ail aurait un effet protecteur contre les cancers de l'estomac et de l'intestin, L'ail est aussi utilisé traditionnellement pour ses propriétés antimicrobiennes et pour le traitement de certaines infections. ( Bianchinie et *al.*, 2001 ; You W et *al.*, 2005). Slowing et *al.* (2001) considèrent que des extraits d'ail peuvent prévenir l'altération du système vasculaire, freiner l'obstruction artérielle et même faire régresser ce processus.

### **I.1.4. *Syzygium* .**

#### **I.1.4.1. Généralités**

Actuellement, dans l'esprit du public, le clou de girofle est une épice employée pour préparer des plats culinaires. Il est aussi assimilé à l'odeur du cabinet dentaire puisque longtemps utilisé en dentisterie. Pourtant, le clou de girofle a été longtemps employé à des fins thérapeutiques au cours de l'histoire en tant qu'antibactérien ou pour éloigner la peste, par exemple. Actuellement, de nombreuses études *in vitro* ont démontrées que le clou de girofle possède des propriétés biologiques intéressantes et approuvées par les autorités (facilite la digestion, carminatif ....)(Delamare, 2014).

**I.1.4.2. Classification botanique de la plante**

Règne : Plantae

Sous-règne : Tracheobionta

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Sous-classe : Rosidae

Ordre : Myrtales

Famille : Myrtaceae

Genre : *Syzygium*

**I.1.4.3. Description de la plante**

**Figure04:** Bourgeons floraux du giroflier qui, séchés, donnent les clous de girofle.

Le giroflier ou girofle, est un arbre petit à moyen, au feuillage persistant et dense, originaire des petites îles volcaniques de l'archipel en Indonésie (Hurthel, 2001). Le fruit est une baie appelée (anthofle) allongée de 2,5 à 3 cm de long sur 1,3 à 1,5 cm de large, de couleur rouge foncé à maturité. Le clou de girofle a un aspect caractéristique brun foncé, à saveur chaude, brûlante, légèrement amère et fortement aromatique (Laredj, 2004).

La floraison se déroule du mois de Septembre au mois de Mars, les fleurs naissent au sommet des rameaux disposées en bouquets terminaux et odorants (Teuscher et al., 2005).

#### I.1.4.4. Composition de l'huile essentielle de clou de girofle

La composition biochimique est susceptible d'évoluer en fonction des conditions de production. Composé chimique principal : Phénols 70 à 85% (Eugénol), autres composés chimiques : Esters 15 à 20% (Benzoate d'eugényl), Sesquiterpènes 5 à 15% (Caryophyllène), traces de : Monoterpènes, Monoterpénols, Oxydes, Cétones, Aldéhydes (Lassus, 2014).

#### I.1.4.5. Application de l'huile essentielle de clou de girofle

L'huile essentielle du giroflier demeure très peu connue. Le public l'utilise pour les maux de dents essentiellement. Son composant principal est l'eugénol, un phénol, qui lui procure une activité antimicrobienne puissante (antibactérienne, antivirale et antifongique). Elle est également puissamment anti-oxydante, propriété encore peu exploitée. Diverses autres propriétés biologiques ont été démontrées au cours d'études scientifiques tels que son activité anti-inflammatoire, etc. Seules quelques indications dérivant de ces études ont été approuvées par l'Agence Européenne du Médicament (EMA). Outre les propriétés scientifiquement approuvées, diverses utilisations traditionnelles de l'huile essentielle demeurent. On lui attribue des effets utérotonique, aphrodisiaque ou encore stimulant intellectuel... En pratique officinale, cette huile essentielle doit être conseillée par un professionnel de la santé car elle peut être utilisée pure que dans de très rares cas et, de par son composé phénolé, l'eugénol, elle peut être toxique pour le foie (Delamare, 2014).

### I.1.5. *Eucalyptus*

#### I.1.5.1. Généralités

Le mot « eucalyptus » vient du grec eu, « bon » et kalyptos, « couvrir », car les pétales et sépales sont soudés. L'autre nom est « gommier » qui fait allusion à la gomme résineuse rouge que les arbres exsudent quand ils sont blessés. Son habitat consiste en général en des sols acides et humides (Gilles, 2008).

Cet arbre vient d'Australie, de Tasmanie et de Malaisie, le genre *Eucalyptus* a donné plus de 600 espèces allant du simple arbuste à de très grands arbres. L'huile essentielle d'eucalyptus est extraite des feuilles fraîches ou bien séchées par distillation (entraînement à la vapeur). Cette dernière est connue pour ses propriétés expectorantes due à l'eucalyptol qu'elle contient.

#### I.1.5.2. Classification botanique de la plante

Règne : Plantae

Sous-règne : Tracheobionta

Embranchement : Magnoliophyta

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe : Eudicota

Sous-classe : Rosidae

Ordre : Myrtales

Famille : Myrtaceae

Genre : *Eucalyptus*

### I.1.5.3. Description de la plante



**Figure05: Morphologie générale de la plante d'eucalyptus**

L'*Eucalyptus* est un arbre toujours vert, au tronc droit, lisse et cendré. Ses écorces sont bruns clairs et minces. L'extrémité des rameaux et les feuilles pendent perpendiculairement au soleil, de manière à avoir un minimum d'évaporation. C'est une plante à feuilles persistantes, plates, luisantes, alternes, bleu gris, glabres; froissés elles ont une odeur forte. Une inflorescence faite de nombreuses petites ombelles de fleurs blanchâtres. Son fruit est une capsule ligneuse, anguleuse à 4 valves contenant des graines. Sa reproduction se fait par graines (Nacoulma OG, 1996).

### I.1.5.4. Composition de l'huile essentielle d'Eucalyptus

D'après Treiner (2000) et Hurtel (2001), La teneur en huile essentielle est comprise entre 0.5 et 3.5%. Le 1,8 -cinéole ou l'eucalyptol représente le constituant majoritaire (70--80%), cet ingrédient principal, a de très fortes propriétés désinfectantes et antibactériennes ; les autres constituants sont majoritairement terpéniques, principalement le  $\alpha$ -pinène, l'aromadendrène, le globulol, viennent ensuite le limonène, le p-cymène, le lédol....

### I.1.5.5. Application de l'huile essentielle d'Eucalyptus

Grâce sa composition chimique et son principal actif 1-8 cinéole l'HE d'eucalyptus présente des vertus considérables, elle est très recherchée pour son action antiseptique et cicatrisante. Antibiotique naturel, elle est surtout utilisée pour soigner certaines maladies broncho-pulmonaires comme la grippe, la toux et la bronchite. En outre, de nombreuses maladies gastro-intestinales peuvent être également soulagées par l'huile essentielle d'eucalyptus grâce à ses propriétés thérapeutiques et antibactériennes (Fabre et al ., 1992). Les huiles essentielles des *Eucalyptus* sont utilisées depuis longtemps en pharmacie pour faire des antiseptiques, des inhalants, etc (Bruneton, 2009). On l'utilise aussi comme aromatisant pour masquer le goût de certaines préparations pharmaceutiques (Treiner, 2000) ainsi qu'en agroalimentaire : boissons, sucreries, crèmes glacées(Grysole, 2005).

## II.2. Autres métabolites végétaux

### II.2.1. Les composés phénoliques

Les polyphénols ou composés phénoliques (CPs), constituent une famille de molécules très largement répandues dans le règne végétal. Ils se trouvent dans la plante, depuis les racines jusqu'aux fruits. Ces CPs sont caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxylés libres ou engagés avec un glucide (Charpentier et Boizot, 2006) et furent les premiers agents antiseptiques et désinfectants largement utilisés (Lansing et al, 2003).

Ces métabolites sont classés en plusieurs groupes principaux qui se distinguent par le nombre d'atomes de Carbone constitutifs et la structure du squelette de base (Robard et al, 1999 ; Michalak, 2006).

**Tableau I : Structure de quelques composés phénoliques**

| Classes            | Structures          | Références       |
|--------------------|---------------------|------------------|
| Quinones           | Quinone             | (Bruneton, 2009) |
| Acides phénoliques | Acide gallique      | (Bruneton, 1999) |
| les coumarines     | Coumarine           | (Cowan, 1999)    |
| les flavonoïdes    | Flavonoïde          | (Ghedira, 2005)  |
| Les Tannins        | Tannin condensé     | (Cowan, 1999)    |
|                    | Tannin hydrolysable |                  |

### II.2.2. Les alcaloïdes

#### II.2.2.1. Généralités

Parmi les premiers produits naturels isolés de plantes médicinales sont les alcaloïdes. Quand ils ont d'abord été obtenus à partir de la matière végétale durant les premières années du 19<sup>ème</sup> siècle, il a été constaté qu'ils contiennent des bases azotées qui forment des sels avec les acides. Le nom d'alcaloïde date du pharmacien allemand Meissner. Ils sont chimiquement des matières organiques composés de carbone, d'hydrogène, d'azote et d'oxygène [Schauenberg et Paris, 2005].

Un alcaloïde est un composé organique naturel d'origine végétale, hétérocyclique avec l'azote comme hétéroatome, de structure moléculaire complexe (Bruneton, 1999), éventuellement reproductibles par synthèse renferment toujours du carbone, de l'hydrogène et le plus souvent de l'oxygène (exceptionnellement quelques alcaloïdes contiennent du soufre) (Yongyu et al, 2011).

### II.2.2.2. Application des alcaloïdes

En raison de leur puissante activité biologique, la plupart des alcaloïdes connus, environ 12.000, ont été exploités en tant que médicaments, des stimulants, des narcotiques, des agents de traitement de la maladie d'Alzheimer et des poisons (Ziegler et Facchini, 2008). En tant que composés du métabolisme secondaire, ils jouent un rôle écologique de défense contre des herbivores. Les pyrrolizidiniques représentent un excellent système pour étudier non seulement l'aspect phytochimique et biochimique des métabolites secondaires des plantes mais également leur évolution moléculaire. (McCalley, 2002).

## II.3. Mécanisme d'action

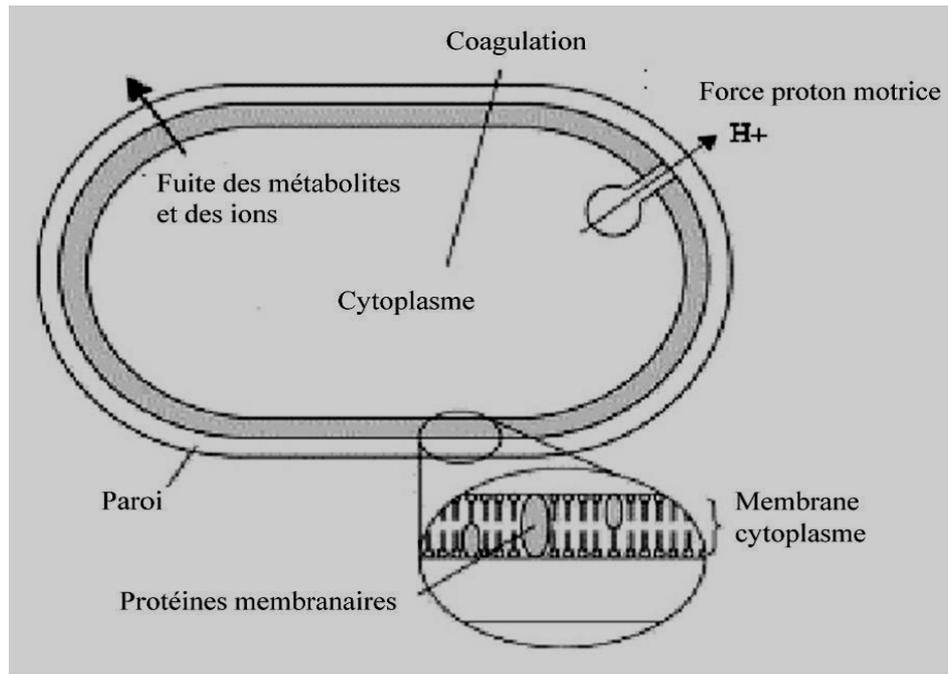
### II.3.1. Mécanisme d'action des huiles essentielles.

Le mode d'action des HEs diffère selon la structure de la membrane des microorganismes, généralement les bactéries à Gram positive sont les plus sensibles que les Gram négatives qui présentent des lipopolysaccharides sur leur membrane extérieure la rendant hydrophile et ça empêche les terpènes hydrophobes d'y adhérer (Cristiani et al., 2007).

Au niveau cellulaire, leur activité antibactérienne n'est pas attribuée à un mécanisme unique mais, à plusieurs actions (Droman et Deans, 2000) liées aux composants hydrophobes ce qui permet aux HEs de traverser la membrane cellulaire (la bicouche phospholipidique) ainsi, altérer sa perméabilité en entraînant la fuite des ions et des macromolécules cela conduit à l'endommagement des structures cellulaires (Burt, 2004).

Rayour (2003) a examiné le mécanisme d'action des H.E des clous de girofle et d'origan (*Origanum vulgare*) simultanément avec deux de leurs composants, le thymol et l'eugénol, sur des bactéries : *E.coli* et *Bacillus subtilis* et qui ont été utilisées respectivement comme modèles de bactéries Gram- et Gram+. Les deux HEs tout comme leurs deux composants ont été capables d'induire une lyse cellulaire. Cette action a été démontrée par la libération de substances absorbantes à 260 nm. Cette libération de substances associée à la rapide mortalité bactérienne pourrait être la conséquence de lésions sur les enveloppes induites par les agents antibactériens. L'utilisation d'un microscope électronique a permis de montrer que les HEs attaquaient en même temps les membranes et les parois cellulaires.

Les travaux de Burt (2004) ont montré qu'une HE active exercera son pouvoir antimicrobien par son interférence avec la bicouche lipidique de la cellule cible grâce à sa propriété hydrophobe, ce qui entraîne une perturbation de la perméabilité et perte des constituants de la cellule. En plus, cette réaction varie en fonction de la nature de la bicouche lipidique, ce qui explique la résistance des bactéries Gram- (Mahmoud et al., 2004). En outre, Dabbah et ses collaborateurs (1970) ont mis en évidence la grande sensibilité des bactéries Gram+ par rapport aux Gram- et aux champignons. Dans la même démarche d'étude, Mahmoud et ses collaborateurs (2004) ont suggéré que l'effet antimicrobien qu'exercent les HEs pourrait être expliqué par la destruction de certains systèmes enzymatiques incluant ceux qui participent dans la production d'énergie cellulaire et la production des composés structuraux. Enfin Caillet et ses collaborateurs (2007) ont signalé que les HEs empêchent la multiplication des bactéries, leur sporulation et la synthèse de leurs toxines.



**Figure 06: Sites et mécanismes dans la cellule bactérienne considérés comme sites d'action pour les composés naturels (Silva NCC et *al.*, 2010).**

### I.3.2. Mécanisme d'action des composés phénoliques

De nombreuses études *in vitro* menées sur les composés phénoliques les ont confirmés comme agents antimicrobiens contre un grand nombre de microorganismes pathogènes, avec des spectres d'activités variables (Scalbert, 1999). En effet certains quinones présentent un effet bactériostatique sur les bactéries à Gram positif mais pas vis à vis des bactéries à Gram négatif (Riffel et *al.*, 2002). Les acides-phénols ont des propriétés antiseptiques urinaires, antifongiques et antibactériennes (Bruneton, 1999).

De récentes études ont montré que les coumarines exercent plusieurs activités antimicrobiennes (Benidicte et Hooper, 1998) : inhibitions de la croissance de *Saccharomyces cerevisiae* et de la germination des spores d'*Aspergillus niger*. Pour l'activité antibactérienne on note qu'ils sont plus efficaces contre les Gram positifs (Benkiki, 2006).

Les flavonoïdes avec leurs différentes classes ont un grand potentiel antibactérien (Alan et Miller, 1996) :

- En se complexant avec des composants des parois avec inhibition de la croissance microbienne (Rojas et *al.*, 1992 ; Perret et *al.*, 1995) ;
- En perturbant leurs métabolismes énergétiques (Jones et *al.*, 1994).

D'autre part, les tanins sont largement connus par leurs propriétés inhibitrices des microorganismes et des enzymes grâce à leur pouvoir à former des complexes stables avec les protéines et en les précipitant (Nguz et *al.*, 1996). Ils exercent une activité antibactérienne par

interaction avec la membrane cellulaire qui induit un changement morphologique de la bactérie, en inhibant l'activité des protéases, des protéines de transport et des adhésines (Cowan, 1999).

### **I.3.3.Mécanisme d'action des alcaloïdes**

Les alcaloïdes sont destinés à agir sur les microorganismes à des concentrations compatibles avec la nature de la paroi. Des quantités variables d'ions de potassium ainsi que les nucléotides ont été divulgués dans les cellules de *Staphylococcus.aureus* (Akinpelu et al, 2016). Leur mode d'action est associé à l'altération de la perméabilité des membranes bactériennes, ce qui est suffisant pour perturber les métabolismes des pathogènes, voir les détruire (Arunachalam et al, 2016).

***Chapitre II :***  
***Les métabolites d'origine microbienne***

## II.1. Les bactériocines

### II.1.1. Généralités

Différentes définitions des bactériocines ont été données au cours du temps.

La définition qui est largement connue est celle de (Heng, 2007) qui définit les bactériocines comme des protéines, ou complexes de protéines, souvent cationiques avec une activité bactéricide contre des espèces proches de la souche productrice. Elles représentent une large classe de substances antagonistes qui varient considérablement du point de vue de leur poids moléculaire, de leurs propriétés biochimiques, de leur spectre d'action et de leur mode d'action (Hammami, 2007). Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont réparties en quatre classes, comme proposé par Klaenhammer (1993). Ces quatre classes sont :

- **Classe I** : Les lantibiotiques : peptides de taille inférieure à 5 kDa, stables à la chaleur et qui contiennent des acides aminés inhabituels soufrés formés post-traditionnellement (c'est-à-dire la lanthionine, la méthyl lanthionine, la déhydrobutyrine et la déhydroalanine) .

- **Classe II** : Peptides de taille inférieure à 10 kDa, stables à la chaleur, ne contenant pas d'acides aminés modifiés. Leur point isolélectrique varie entre 8 et 10.

- **Classe III** : Protéines de taille supérieure à 30 kDa et sensibles à la chaleur.

- **Classe IV** : Peptides requérant une partie carbohydratée ou lipidique pour avoir une activité.

Bactérienne. Aucune bactériocine de cette classe n'a été décrite.

L'effet d'une bactériocine est soit bactéricide, provoquant la mort de la bactérie cible, soit bactériostatique inhibant la croissance.

### II.1.2. Application des bactériocines

Les bactériocines sont habituellement reconnues comme étant des substances sensibles aux protéases digestives et ne sont pas toxiques pour les cellules eucaryotes (Guiraud, 2003). Elles ont une grande tolérance aux variations de pH et aux traitements thermiques. Leur spectre antimicrobien peut être large ou étroit, elles peuvent donc cibler sélectivement des bactéries pathogènes ou altérantes sans inhiber les bactéries indispensables et ont un mode d'action bactéricide. Elles présentent ainsi, un intérêt potentiel d'application en conservation alimentaire (Deegan et al., 2006).

La seule utilisée actuellement dans la conservation alimentaire est la nisine que l'on trouve dans les fromages fondus qui est très efficace pour empêcher la germination des spores de *clostridies* , germe responsable du gonflement tardif, odeur désagréable et liquéfaction de ces produits (Gouget, 2013).

D'une façon générale, ces métabolites microbiens présentent des caractéristiques compatibles avec la fabrication, le traitement et la consommation des produits alimentaires.

En ajout à leur utilité dans le domaine agroalimentaire, les bactériocines ont aussi un immense potentiel dans le domaine médical. D'ordre général, les bactériocines peuvent être utilisées contre n'importe quel infection ou malaise causés par des bactéries pathogènes comme l'acné, des cas de fibrose kystique, la tuberculose, les otites, les infections mammaires, les vaginites, etc. Plusieurs essais cliniques sont en cours pour rendre ces produits disponibles (Tagg, 2004).

## II.2. L'acide lactique

### II.2.1. Généralités

L'acide lactique ou l'additif E270 est un intermédiaire métabolique retrouvé dans de nombreux organismes vivants allant des procaryotes anaérobies à l'homme, et représente l'un des acides organiques les plus importants (Givry, 2006), il est incolore ou légèrement jaunâtre, peu volatil et sirupeux de saveur nettement acide et à gout légèrement lacté. Il se présente sous forme liquide soluble dans l'eau, l'alcool, l'éther et insoluble dans le chloroforme. Ses sels de sodium (E325), de potassium(E326) et de calcium(E327) se présentent quant à eux sous forme de poudre et sont également solubles dans l'eau (Djidel, 2007).

Il agit comme agent bactériostatique notamment sur les bactéries pathogènes (Salmonelles, Listeria, etc.), et a de plus, un effet dépressur d' $a_w$  intéressant.(Chene,2002).

### II.1.2. Application de l'acide lactique

L'acide lactique étant un acide naturel et non toxique, trouve diverses applications dans les industries chimiques, alimentaires et pharmaceutiques. Il est également utilisé notamment dans la production de polymères biodégradables (Boudjellal et al., 2001 ; Djidel,2007).

- En industrie alimentaire

De nombreux produits alimentaires se conservent grâce à un pH faible ; soit parce qu'ils contiennent naturellement une teneur élevée en acides organiques (produits fermentés comme les yaourts), soit parce que des acides leurs sont volontairement ajoutés (confiseries, boissons, etc.). Dans ces produits l'acidité participe à la conservation, mais elle est également recherchée pour la saveur qu'elle apporte (Chene, 2002).

Le secteur alimentaire est le plus grand consommateur de lactate, ce dernier est utilisé comme :

- Agent antimicrobien conservateur pour les saumures, les produits laitiers, les viandes et le pain.
- Acidulant pour les bières, les vins et les sucreries.
- Stabilisant et épaississant (lactate de calcium)
- Source de fer pour supplémenter des laits maternisés (lactate ferreux)
- Exhausteur de gout et émulsifiant (lactate de potassium et d'aluminium) (Djidel, 2007).
- En industrie pharmaceutique
- Solution de dialyse rénale (lactate de sodium)
- Traitement des déficiences en minéraux de magnésium et de calcium (lactate de magnésium et de calcium).
- Synthèse des molécules chirales (Djidel, 2007).

- En industrie cosmétique
- Il est utilisé dans les produits capillaires pour améliorer la texture des cheveux.
- Dans les dentifrices comme agent détartrant et dans les lotions contre l'acné.
- Agent d'éclaircissant et de rajeunissement de la peau (Djidel, 2007).

### II.3. Les antibiotiques

Les antibiotiques sont substances naturelles élaborée par des microorganismes agissant de façon très spécifique sur une cible moléculaire précise, ils se caractérisent par leur synthèse enzymatique, utilisés dans le traitement des infections bactériennes. Parmi les antibiotiques les plus connus, citons la streptomycine, employée pour traiter la tuberculose, et la pénicilline (extraite du champignon *Penicillium notatum*) (Hanock et al, 1999).

Ces métabolites ont la propriété d'interférer directement avec la prolifération des microorganismes à des concentrations tolérées par l'hôte. (Avril et al., 2002).

### II.4. Mécanisme d'action

#### II.4.1. Mécanisme d'action des bactériocines

##### II.4.1.1. Action des bactériocines de la classe I : Les lantibiotiques

Cette classe a principalement la membrane cytoplasmique pour cible. Pour les lantibiotiques, l'effet antimicrobien est le résultat à la fois de la perméabilisation de la membrane cytoplasmique et de l'inhibition de la biosynthèse de la paroi bactérienne ou de l'inactivation d'une enzyme essentielle à la biosynthèse de la paroi bactérienne (Chatterjee *et al.*, 2005a, Twomey *et al.*, 2002).

##### II.4.1.2. Action des bactériocines de classe II

Le mécanisme d'action supposé des bactériocines de classe IIa est l'interaction de la bactériocine avec la membrane ou un récepteur spécifique, la « mannose perméase », pour ensuite former un pore dans la membrane de la cellule, ce qui induit la perméabilisation de la membrane, la dissipation des deux composantes de la force proton motrice et la mort de la cellule (Dalet et al., 2000 ; Héchard et al., 2001 ; Gravesen et al., 2002 ; Arous et al., 2004 ; Vadyvaloo et al., 2004 ; Bauer et al., 2005).

Les bactériocines de classe IIb ont en général un spectre d'action inhibant une large gamme de bactéries Gram<sup>+</sup>. Elles forment des pores et rendent la membrane perméable à différentes petites molécules, des cations monovalents ou des anions, ce qui dissipe une ou les deux composantes de la force proton motrice (Oppegard et al., 2007).

##### II.4.1.3. Action des bactériocines de classe III

Le mode d'action de ces bactériocines diffère complètement des bactériocines des autres classes. En effet, l'enterolysin A, la zoocin A et la millericin B agissent par l'hydrolyse des liens peptidiques des peptidoglycanes des cellules cibles. La zoocin A a un spectre d'action étroit alors que l'enterolysin A et la millericin B ont un spectre d'action large. L'helveticin J a un mode d'action bactéricide (Nilsen *et al.*, 2003).

### II.4.2. Mécanisme d'action des acides organiques

Le mode d'action antimicrobienne des acides organiques est actuellement présenté comme le résultat de trois effets différents. D'une part, l'acidité des acides organiques abaisse le pH de l'environnement de nombreux microorganismes pathogènes ou indésirables de telle sorte que la croissance et la prolifération de ces derniers sont impossibles ou fortement limitées (Gouget, 2013). D'autre part, les molécules acides non dissociées sont lipophiles et peuvent pénétrer dans la membrane plasmique de certains pathogènes, comme les salmonelles par exemple. À l'intérieur de la cellule, les acides réduisent le pH, ce qui incite le microorganisme à des mécanismes de régulation énergivores qui l'affaiblissent. Par ailleurs, les acides inhibent l'activité de certains systèmes enzymatiques, dont ceux nécessaires pour la multiplication du génome ADN. Le microorganisme ne peut donc plus se multiplier (Chene, 2002 ; Servin, 2004). Et troisièmement, les molécules acides dissociées, qui ne peuvent pas pénétrer dans la membrane plasmique, endommagent la structure des protéines de la membrane. Sa perméabilité aux minéraux comme le sodium ou le potassium s'en trouve ainsi modifiée. La modification de la pression osmotique qui en découle entraîne la mort de la cellule (Papagianni, 2007).

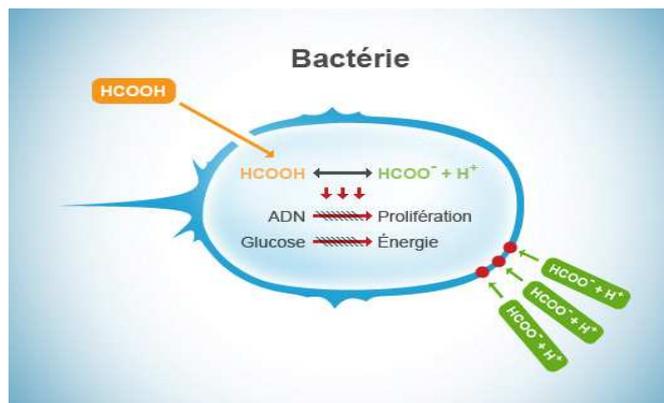


Figure 07: Mode d'action antimicrobienne des acides organiques

### II.4.3. Mécanisme d'action des antibiotiques

L'action antimicrobienne des antibiotiques comporte des effets antifongiques et antibactériens. Ils agissent sur les acides nucléiques en ciblant la transcription bactérienne, des concentrations élevées inhibent les interactions protéiques et l'ARN polymérase (Ma et al, 2016). En outre elles inhibent la synthèse de la paroi bactérienne, cette dernière possède des molécules associées à sa structure qui fixent des antibiotiques ce qui conduit à une lyse cellulaire (Chan 2016).



***Chapitre III :***  
***Les agents antimicrobiens synthétiques***

### III.1. les complexes chimiques

#### III.2.1 Généralités

La chimie et la biologie font aujourd'hui partie de notre environnement quotidien, ces deux disciplines étant à la croisée de nombreuses industries et de nombreux secteurs. La chimie organique d'hier s'étend aujourd'hui aux molécules biologiques, aux molécules inorganiques et aux macromolécules. Elle crée des édifices plus ou moins complexes jusqu'à l'élaboration d'une chimie supramoléculaire fondée sur des interactions diverses entre molécules et explique leurs propriétés.

De nos jours, les complexes de métaux de transition connaissent un développement spectaculaire. Ce développement est observé dans un grand nombre de domaines : biologie, médecine, catalyse, l'industrie pharmaceutique, métallurgie et l'environnement.

Un complexe chimique est constitué d'un ion métallique central sur lequel viennent se fixer un certain nombre de molécules neutres ou d'ions, appelés ligands. Les propriétés chimiques de l'assemblage qui en résulte dépendent de la nature de la liaison entre l'ion métallique et les ligands (ion-dipôle, ionique) et de l'arrangement géométrique de ceux-ci autour de l'ion central, lui-même contrôlé par les propriétés électroniques de l'ion et des ligands (Kettle, 1999 ; Shriver et Atkins, 2001).

Lorsqu'un ion s'entoure de ligands pour former un complexe, on parle de réaction de complexation. Ces réactions provoquent souvent des changements de couleur, démontrant que les propriétés électroniques des complexes sont différentes de celles des réactifs de départ.

La classification des complexes se base sur le nombre d'ions (ou d'atomes) centraux qu'ils comportent. Les complexes dont les formules sont organisées autour d'un seul ion central sont des complexes monométalliques (mononucléaires). Si l'entité complexe comporte deux ou plusieurs ions métalliques on la désigne par les termes : bimétallique (binucléaire), trimétallique (trinucléaire), polymétallique (polynucléaire) (Fay et al., 2005).

Les complexes des métaux de transition avec les acides aminés ont constitué la base de nombreuses études en raison de leur activité biologique. Aussi, les acides aminés participent souvent à la formation de liaisons hydrogène dans la formation de leurs complexes ils sont considérés comme des agents complexants importants (Sharma et al., 2005).

Les composés comportant la purine et la pyridine ainsi que leurs dérivés (Adénine, Guanine, Cytosine, Thymine et Uracile) sont des plus intéressants du fait de leur large domaine d'application. Ils jouent particulièrement un rôle significatif dans beaucoup de systèmes biologiques. (Olmezet al., 2001).

Certains auteurs ont tenté de corrélérer les activités biologiques et pharmaceutiques à des propriétés physicochimiques de certaines structures. Ils ont constaté que les liaisons hydrogène intramoléculaires ou intermoléculaires affectaient de façon remarquable les activités biologiques de ces composés. Dans ce contexte, Endo et coll, 1982, ont observé que La liaison hydrogène  $H...O=C$  est responsable de l'augmentation de l'activité antibactérienne.

Noyce et al ., (2006) ont mené une étude dans l'objectif des chercheurs est d'évaluer sept alliages de cuivre pour déterminer leur capacité à réduire la viabilité d'*E.coli* O157, Leurs résultats démontrent clairement les propriétés antimicrobiennes des alliages de cuivre vis à vis d'*E.coli* O157, et par conséquent, ces alliages ont le potentiel de contribuer à la sécurité alimentaire.

Grobe et al., (2014) ont étudié le rôle de la survie des cellules d'*E.coli* sur des surfaces solides en cuivre. Leurs résultats montrent qu'un mutant d'*E.coli* a été plus rapidement inactivé et son ADN a également été moins stable. Cet effet peut expliquer certaines des différences dans les modes de destruction des bactéries Gram- et Gram+ sur ce matériel.

### III.2.2. Applications

Les complexes de métaux de transition connaissent un développement remarquable dans un grand nombre de domaines : biologie, médecine, catalyse, l'industrie pharmaceutique, métallurgie et l'environnement. En chimie des solutions ont des utilités multiples comme :

- Solubiliser un métal contenu dans un minerai (exemple : l'or solubilisé comme un complexe cyanuré) ;
- Caractériser la présence d'une espèce chimique par formation d'un complexe coloré (Jacobsen, 1993).
- Ceux de platine sont utilisés en médecine dans le traitement de certains cancers (cisplatine, carbo-platine, oxali-platine...).
- La capacité complexant de l'EDTA est mise à profit dans le traitement d'intoxication par des métaux, en particulier le plomb (Losada, 2001)

### II.2. Mécanismes d'action des complexes chimiques

De nombreuses études ont porté sur le mécanisme d'action des complexes métalliques notamment le cis-platine (Rosemberg, 1978; Jamieson et Lippard, 1999). Il a été montré que le complexe reste dans son état neutre, il entre ensuite dans la cellule vivante par diffusion passive à travers la membrane. La diminution de la concentration en ions chlorure facilite son hydrolyse en complexes très réactifs.

Les complexes très électrophiles obtenus par l'hydrolyse peuvent réagir avec divers nucléophiles cellulaires, comme l'ARN, l'ADN, les protéines, le glutathion ou la méthionine. Parmi ces composants cellulaires, les cibles principales sont les atomes d'azote des bases purines et pyrimidines de l'ADN.

Il a été démontré que l'ADN est la cible la plus préférée pour la plupart des activités biologiques anti-cancer et des thérapies antivirales (Scott et Bradbury ,1994).En particulier, le cuivre et ses ligands ont été largement étudiés en raison de leurs fortes interactions avec l'ADN via des associations de surface ou intercalations puis de clivage de l'ADN à travers des mécanismes d'hydrolyse ou d'oxydation (Chevry, 2011).

Selon l'étude de Santoyo *et al.*, (2005), un large éventail d'activités biologiques a été attribué au complexe de cuivre, en l'occurrence les activités antibactérienne, antifongique, antioxydante et anticancéreuse.

## ***Chapitre IV :***

### ***Interactions entre les agents antimicrobiens***

### IV.1. Action combinée des agents antimicrobiens

Plusieurs travaux ont montré l'utilité des combinaisons des agents antimicrobiens du fait qu'elles offrent de nombreux avantages comme la réduction du coût et les concentrations des substances utilisées ainsi éviter l'altération de la qualité organoleptique et leurs effets indésirables.

Evandro et al. (2009) ont pu déterminer l'efficacité de la combinaison de l'huile essentielle de thym et l'acide lactique sur les staphylocoques et son intérêt qui pourrait apparaître comme une alternative intéressante pour l'industrie alimentaire.

D'après Carrion-Granda et al. (2016), il est possible d'améliorer la qualité microbiologique des crevettes décortiquées et contrôler la croissance de la détérioration par les microorganismes pathogènes pendant l'entreposage frigorifique par l'application d'un revêtement de chitosane incorporé d'une petite quantité de l'huile essentielle de thym.

Cox et al., (2000), ont proposé de combiner des agents bactéricides et bactériostatiques qui contiennent des composés agissant sur la même cible et présentant des interactions chimiques.

Fei et al.,(2011) ont expliqué l'effet synergique entre certaines huiles essentielles (origan, basilic et bergamote) contre *E.coli* et *S.aureus* qui se porte sur la perturbation de l'intégrité membranaire des cellules.

Selon Horvath et al. (2016), la combinaison des huiles essentielles de : cannelle, clou de girofle, thym et menthe verte peut conduire à un effet synergique contre les levures et les moisissures du genre *Condida albicans*, *Aspergillus fumigatus* et *Fusarium solani*...Par ailleurs la meilleure combinaison a été clou de girofle/ cannelle conduisant à un effet additif dans tous les cas. L'huile de graines de cumin a montré les deux interactions synergique et antioxydante.

Une étude a été réalisée afin d'évaluer les possibles interactions synergiques et leur efficacité antibactérienne et antioxydante des huiles essentielles de graines de cumen et de coriandre par rapport à six bactéries d'origine alimentaire importantes (*Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, , *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium*). Les résultats démontrent que la combinaison d'huile de pépins de coriandre / cumin pourrait en effet être utilisé comme une source potentielle antimicrobienne naturelle et comme agents antioxydants dans les industries pharmaceutiques et alimentaires (BAG et al., 2015).

### IV.2. Comparaison entre les agents antimicrobiens

#### IV.2.1. Huiles essentielles versus antibiotiques

Historiquement, au regard des centaines de milliers d'années qui les ont précédés, l'apparition des antibiotiques dans l'évolution globale de l'humanité ne représente qu'un "clin d'œil".

Les plantes aromatiques, elles, ont toujours fait partie de l'environnement naturel et leur usage culinaire, pharmaceutique, esthétique et sacré est une constante retrouvée dans toutes les ethnies ( Franchomme et Péroël,2001).

Chimiquement, les antibiotiques sont constitués d'une unique molécule, à présent produite en masse par l'industrie pharmaceutique. Les essences sont, elles, produites par le monde végétal, et sont (pour la plupart) constituées de multiples molécules leur conférant des propriétés variées.

Dans la mesure où il est constitué d'une seule molécule, il est aisé pour une bactérie de synthétiser une enzyme ou une molécule rendant l'antibiotique inactif. Dans certains cas, le processus se développe à tel point que certaines bactéries deviennent capables de se nourrir de cette substance sensée les détruire. Cela ne se produit jamais avec les traitements aromatiques et même si des résistances se manifestent, le plus souvent elles diminuent avec l'amélioration du terrain et n'apparaissent pas chez d'autres patients. (Franchomme, 2001).

La molécule synthétique permet seulement une action plus souvent bactériostatique. Il suffit alors qu'une des bactéries développe par mutation une enzyme permettant d'inactiver cette molécule, ou d'en inverser l'action, pour mettre en péril toute l'action thérapeutique (Poole, 2002). Aucun antibiotique n'inhibe l'ensemble des microorganismes et quelques microorganismes sont naturellement résistants à certains antibiotiques (Meyer *et al.*, 2004).

Il y a plusieurs raisons pour lesquelles un microorganisme peut avoir une résistance naturelle à un antibiotique (Madigan et Martinko, 2007) :

- Il peut ne pas posséder la structure ciblée par l'antibiotique. Par exemple, certaines bactéries ne possèdent pas de paroi bactérienne typique et sont donc résistantes aux pénicillines.
- Le microorganisme peut être imperméable à l'antibiotique. Ainsi, la plupart des bactéries à GRAM négatif sont imperméables à la pénicilline G.
- Il peut modifier la structure chimique de l'antibiotique en une forme inactive. Beaucoup de staphylocoques contiennent des  $\beta$ -lactamases qui peuvent couper le cycle  $\beta$ -lactame de la plupart des pénicillines.
- Il peut modifier la cible de l'antibiotique.
- Le microorganisme peut développer une voie biochimique résistante. Par exemple, de nombreux microbes pathogènes développent la résistance aux molécules de sulfamides, empêchant la production d'acide folique chez les bactéries. Les souches résistantes modifient leur métabolisme pour assimiler l'acide folique présent dans l'environnement, évitant l'utilisation de la voie métabolique bloquée par les sulfamides.
- Le microorganisme peut être capable de relarguer un antibiotique entré dans la cellule (mécanisme d'efflux), comme décrit dans la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* à de nombreux antibiotiques.

L'huile essentielle va au-delà, et outre la déstructuration de l'enveloppe bactérienne et l'attaque des organites cytoplasmiques, elle agit parallèlement sur l'organisme en son entier. Il est, dans ces conditions, bien improbable qu'une bactérie parvienne à muter suffisamment dans la durée de vie dont elle dispose afin de déjouer toutes ces différentes activités (Rasooli *et al.*, 2006).

L'apparition de phénomènes d'antibiorésistances et la création de souches bactériennes mutantes redoutables (ainsi le banal staphylocoque se transformant en germe quasiment invincible à l'hôpital), certaines molécules antibiotiques présentent une toxicité sévère (foie, rein, etc.). Plus grave encore, les effets secondaires occultes entraînant l'inhibition progressive des systèmes de défense du corps et le déséquilibre de la flore intestinale ouvrent

la porte aux candidoses et aux viroses et aux pathologies qui y sont directement et indirectement liées.

Les huiles essentielles, utilisées selon des normes précises, donnent lieu à des "effets secondaires bénéfiques" à l'ensemble de l'organisme et la flore symbiotique, habituée depuis des milliers d'années à vivre avec les molécules aromatiques, est respectée. Enfin, le système immunitaire voit son activité modulée dans le sens le plus favorable à la défense et à l'épanouissement de l'organisme ( Franchomme et Péroël,2001).

#### IV.2.2. Bactériocines versus antibiotiques

L'effet miracle des antibiotiques n'aura pas duré à cause de leur sur-utilisation qui a engendré l'émergence de souche de bactéries résistantes comme les redoutables MRSA (*Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*) et VRE (*vancomicine resistant enterobaccilus*). Ainsi, plusieurs restrictions gouvernementales ont été mises en place pour essayer de freiner la résistance bactérienne incluant celle de la Food and Drug Association (FDA) aux États-Unis qui a banni l'utilisation d'antibiotiques dans le domaine agro-alimentaire vers la fin des années 60. De ce fait, plusieurs compagnies de productions se sont tournées vers les bactériocines pour assurer la qualité de leurs produits puisque les bactériocines sont, pour la plupart, inodores, sans gout, mais surtout, non-toxiques.

Elles sont donc parfaites pour être utilisées comme bio-préservatifs et prennent maintenant une importante partie du marché multimilliardaire des suppléments alimentaire ( Lussier-Price,2008)

L'aspect qui retient le plus l'attention au sujet des bactériocines est qu'elles possèdent un mécanisme d'action différent par rapport aux antibiotiques. Ces derniers peuvent inhiber la synthèse de la membrane cellulaire et des éléments essentiels pour la survie des bactéries tandis que les bactériocines elles forment des trous dans la membrane bactérienne. Ainsi, théoriquement, les bactéries résistantes aux antibiotiques ne devraient pas être résistantes aux bactériocines puisqu'elles ne font pas appel au même mécanisme. En effet, en 2008, une étude *in vivo* portée chez les souris a montrée que la Mersacidine (bactériocine produit par l'espèce *Bacillus*) était capable d'inhiber la croissance d'une des souches bactériennes résistantes aux antibiotiques (Sass *al*, 2008).

#### IV.2.3. Combinaison des bactériocines avec d'autres agents

La combinaison des bactériocines avec d'autres traitements de conservation chimique ou physique donne des résultats prometteurs pour la conservation des aliments.

Les molécules chimiques peuvent être des acides organiques, le nitrite, le chlorure de sodium, l'éthanol, des huiles essentielles (l'impact sur les propriétés organoleptiques doit être soigneusement évalué) ou des agents chélatants tel que l'EDTA, le phosphate trisodique, le citrate.

Ces agents chélatants permettent de séquestrer les ions magnésium des lipopolysaccharides de la membrane externe des bactéries Gram- permettant aux bactériocines d'atteindre la membrane interne, siège de leur activité. Les traitements physiques peuvent être des traitements thermiques, le stockage sous atmosphère contrôlé, l'application de champs

électriques ou l'application des hautes pressions (Rodgers, 2004 ; Deegan *et al.*, 2006 ; Galvez *et al.*, 2007). D'autre part, l'utilisation d'inhibiteurs de protéases ou de protéines de soja a été suggérée afin de prévenir la dégradation des bactériocines par les protéases présentes dans le produit à conserver (Kouakou *et al.*, 2008)..

*Deuxième partie :*  
*Etude expérimentale*

## *Matériel et méthodes*

Ce travail expérimental a été réalisé pendant une durée de trois mois au sein du laboratoire de microbiologie la faculté des sciences biologiques et des sciences agronomiques, Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou.

Il a pour objectif :

- Evaluation du pouvoir inhibiteur de la croissance bactérienne de six agents antimicrobiens naturels à savoir : l'huile essentielle de thym, d'ail, de clou de girofle ; d'eucalyptus, de la sauge ainsi que acide lactique.
- Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI), ainsi que les concentrations minimales bactéricides (CMB).
- Etude des interactions entre les agents antimicrobiens actifs par combinaison deux à deux et détermination des concentrations sub-inhibitrices.

## **I. Matériel biologique**

### **I.1. Les souches bactériennes testées**

Le choix des souches bactériennes testées dans cette étude a été basé sur l'implication dans la pathologie humaine, l'altération des aliments ainsi que leurs résistances aux antibiotiques .Pour cela nous avons sélectionné : deux bactéries à Gram+, quatre bactéries à Gram- qui sont représentées dans le Tableau II.

**Tableau II: Etat descriptif des différentes bactéries utilisées dans cette étude.**

| Souches bactériennes                      | Morphologie et type de Gram               | Habitat et origine   | Pouvoir pathogène  | Provenance   |
|---|---|--|--|--|
| <i>Eschérichia. coli</i> ATCC 25923       | Coccobacilles à Gram négatif              | Commensale du tube digestif de l'homme et des animaux                                  | Diarrhées, gastro-entérites<br>Infections urinaires  | Laboratoire de microbiologie du centre hospitalier universitaire (CHU) Mustapha Bacha d'Alger  |
| <i>Pseudomonas. aeruginosa</i> ATCC 27853 | Bacilles à Gram négatif                   | Germe ubiquitaire, vivant en milieu humide et fréquent en milieu hospitalier           | Infections pulmonaires,<br>Infections urinaires,<br>Méningites,<br>septicémies   | Laboratoire de microbiologie du centre hospitalier universitaire (CHU) de Tizi-Ouzou Nedir Mohamed                                     |
| <i>Kliebsiella. pneumoniae</i>            | Bacilles à Gram négatif                   | Commensale du tube digestif et de l'appareil respiratoire de l'homme et des animaux    | Infections respiratoires,<br>Infections urinaires,<br>septicémies  | Laboratoire de microbiologie du centre hospitalier universitaire (CHU) de Tizi-Ouzou Nedir Mohamed                                     |
| <i>Proteus. mirabilis</i>                 | Bacilles à Gram négatif                   | Commensale de l'intestin de l'homme et des animaux                                     | Infections localisées surtout cutanée<br>Infections des voies respiratoires<br>Septicémies   | Laboratoire de microbiologie du centre hospitalier universitaire (CHU) de Tizi-Ouzou Nedir Mohamed                                     |
| <i>Staphylocoque. aureus</i> ATCC 43300   | Cocci en grappes de raisin à Gram positif | Ubiquitaire dont le réservoir est localisé au sein de la peau et des muqueuses         | Intoxication alimentaire<br>Infections cutanées et des muqueuses,<br>Septicémies,<br>pneumonies  | Laboratoire de microbiologie du centre hospitalier universitaire (CHU) Mustapha Bacha d'Alger  |
| <i>Bacillus. cereus</i>                   | Bacilles à Gram positif                   | Germe ubiquitaire dans le sol, dans l'eau de mer, dans l'eau douce et sur les plantes. | Intoxications alimentaires<br>Infections des plaies, s,<br>méningites,<br>infections du système nerveux central,<br>infections respiratoires . | laboratoire de microbiologie de la société pharmaceutique (Aldaph-Novonordisk) sise à la zone industrielle Oued-Aissi de Tizi - Ouzou. |

## **I.2. Les agents antibactériens testés :**

### **I.2.1 L'huile essentielle de thym**

L'huile essentielle de thym (commerciale) testée durant notre étude est issue d'une plante appartenant à la famille des lamiacées ; il s'agit de *Thymus vulgaris*.

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

### **I.2.2. L'huile essentielle de l'ail**

L'huile essentielle testée durant notre étude est issue d'une plante appartenant à la famille des Liliacées.

Cette huile est de couleur transparente, visqueuse, non miscible avec l'eau. Elle a été conservée en position verticale à l'obscurité et au frais (réfrigération).

### **I.2.3. L'huile essentielle de clou de girofle**

L'huile essentielle testée durant notre étude est issue d'une plante appartenant à la famille des Myrtacées.

Cette huile est de couleur transparente, visqueuse, non miscible avec l'eau. Elle a été conservée en position verticale à l'obscurité et au frais (réfrigération).

### **I.2.4. L'huile essentielle d'eucalyptus**

L'huile essentielle testée durant notre étude est issue d'une plante appartenant à la famille des Myrtacées.

Cette huile est de couleur jaune pâle, forte avec une odeur fraîche et très caractéristique, non miscible avec l'eau. Elle a été conservée en position verticale à l'obscurité et au frais (réfrigération).

### **I.2.5. L'huile essentielle de la sauge**

L'huile essentielle testée durant notre étude est issue d'une plante appartenant à la famille des Lamiacées ; il s'agit de *Salvia officinalis*.

Cette huile est de couleur jaunâtre, visqueuse, non miscible avec l'eau. Elle a été conservée en position verticale à l'obscurité et au frais (réfrigération).

Toutes les huiles essentielles testées, excepté l'huile de thym, nous ont été aimablement fournies par monsieur Libdiri Farid, chargé de cours à l'université de Bouira.

### **I.2.6. L'acide lactique**

L'acide lactique utilisé est commercialisé par la société de chimie cosmétique et de pharmacie, ses caractéristiques ; présentées sur la fiche technique sont comme suit :

- Aspect : liquide visqueux miscible avec l'eau et solvants organiques.
- Couleur : transparent à jaune.
- Essai : 79.5-80.5%
- Gravité spécifique : 1.13-1.20g/ml
- Total de métaux lourds :  $\leq 10$ ppm
- Ph : 4.4

### **I.2.7. Le complexe chimique à base d'uracile.**

Le complexe chimique testé nous a été aimablement fourni par, Dr Adkis, professeur au département de chimie, faculté des sciences, Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou

Cet échantillon est de couleur brune, il est à base d'uracile.

## **II. Vérification des souches microbiennes**

### **II.1. Purification des souches bactériennes**

Les souches bactériennes testées sont des souches pures conservées dans le milieu TSA à 4°C.

Chacune des quatre souches a été repiquée plusieurs fois sur le milieu MH et incubée à 37°C afin d'obtenir des cellules jeunes de 15 à 18 heures. Une coloration différentielle de Gram a été réalisée suivie d'une observation microscopique dans le but de déterminer : la forme, la taille, le mode d'agencement des cellules ainsi que le type de Gram.

La coloration de Gram (voir annexe2).

### **II.2. Préparation de l'inoculum**

#### **II.2.1. Préparation de la pré-culture**

Les tests antibactériens sont réalisés à partir de cultures jeunes en phase exponentielle de croissance (culture de 15 à 18 heures).

Les souches bactériennes sont repiquées sur le milieu MH gélosé, puis les boîtes sont incubées à 37°C pendant 16 heures.

#### **II.2.2. Préparation de la suspension bactérienne**

Dans la zone septique du bec bunsen et à partir de cultures pures de 16 heures, prélever à l'aide d'une pipette Pasteur quelques colonies bien isolées de chacune des souches à tester. Décharger la pipette dans 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%, puis homogénéiser. Les suspensions bactériennes sont ensuite standardisées à  $10^6$  UFC/ml en

effectuant des dénombrements sur la cellule de Malassez et des dilutions décimales, si nécessaire.

### **III. Evaluation qualitative et quantitative de l'activité antibactérienne.**

#### **III.1. Test in vitro**

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a été réalisée par la méthode des puits décrite par Ismail *et al.* (2008). Cette méthode consiste à estimer l'inhibition de la croissance des germes testés au contact des différents échantillons d'agents antimicrobiens étudiés.

#### **III.2. Protocole expérimental**

Couler aseptiquement le milieu de culture gélosé Mueller-Hinton en surfusion dans des boîtes de Pétri en raison de 20ml par boîte. Laisser refroidir et solidifier.

À partir d'une suspension bactérienne standardisée à  $10^6$  UFC/ml, nous avons prélevé 100  $\mu$ l de la suspension bactérienne que nous avons étalée à l'aide d'un râteau sur la surface du milieu gélosé. Et on laisse sécher.

Des puits d'environ 6mm de diamètre ont été confectionnés à l'aide d'une pipette Pasteur retournée et flambée à son extrémité large. À l'intérieur de ces puits on dépose 40 $\mu$ l de chaque échantillon à tester. Les boîtes sont, ensuite, fermées et laissées diffuser pendant 30 minutes.

De même, des antibiogrammes avec des antibiotiques de référence : Amoxicilline, Amoxicilline-acide clavulanique, Ciprofloxacine, Sulfaméthoxazole+Triméthopri et Chloromphenicol ont été réalisés afin de servir de témoins positifs pour comparer les résultats. Aussi, des puits ne contenant que du DMSO, de l'eau distillée stérile ainsi qu'avec les différents échantillons ont été réalisés afin de servir de témoins négatifs.

La lecture est réalisée après 24 heures d'incubation à 37°C. Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés à l'aide d'une règle et exprimés en millimètre (mm) (le diamètre du puits (6mm) est inclus).

Selon Ponce *et al.* (2003), la sensibilité des différentes souches vis-à-vis des H.E. étudiées est classée selon le diamètre d'inhibition selon les critères suivants :

Non sensible ou résistante, si :  $\odot < 8$  mm ;

Sensible si :  $9$  mm  $< \odot < 14$  mm ;

Très sensible si :  $15$  mm  $< \odot < 19$  mm ;

Extrêmement sensible si :  $\odot \geq 20$  mm.

## **IV. Détermination des CMI et CMB**

### **IV.1. Détermination des CMI**

La méthode par dilution a pour but d'évaluer des concentrations minimales inhibitrice. Celle-ci consiste à déterminer la plus faible concentration d'un agent antimicrobien, nécessaire pour inhiber la croissance d'un microorganisme (Oussou *et al.*, 2008; Derwich *et al.*, 2010).

#### **IV.1.1. Préparation des dilutions**

L'HET a été dilué au 1/2 dans le DMSO sigma (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O<sub>S</sub>) dont sa concentration est de 4.4mol/l.

La dilution de l'HET a été réalisée au 1/2 dans du DMSO, celle de l'acide lactique au 1/4 dans de l'eau distillée stérile.

#### **IV.1.2. Méthode des spots**

##### **Principe de la méthode**

Ce test a pour objectif d'estimer la concentration minimale inhibitrice des souches testées au contact de différentes concentrations des agents antimicrobiens étudiés (Sokmen *et al.*, 2004).

Cette technique est réalisée en trois étapes :

- Dans des boîtes de Pétri stériles, couler 15ml du milieu MH qui va servir d'apport en nutriments pour les souches bactériennes ;
- Réaliser une dilution volume à volume : dans 3ml du milieu de culture, mélanger des volumes variables de l'agent antimicrobien à tester. Puis, la dilution obtenue est versée et étalée d'une façon homogène dans les boîtes de Pétri préalablement coulées ;
- Après solidification, déposer 3 spots de 5µl de la suspension bactérienne à 10<sup>6</sup> UFC/ml en forme de triangle.

Nous avons aussi réalisé un témoin positif contenant uniquement la suspension microbienne, et un témoin négatif ne contenant uniquement l'agent antimicrobien

Les boîtes sont, ensuite, incubées à 37°C pendant 24h.

La plus petite concentration pour laquelle il n'y'a aucun développement visible de la souche est considérée comme étant la CMI.

### **IV.2. Détermination des CMB**

La détermination des concentrations minimales bactéricides (CMB) est réalisée par un prélèvement, à l'aide d'une pipette Pasteur, dans les zones d'inhibition (ne présentant aucune culture visible). Chaque prélèvement est, ensuite, repiqué en stries sur le milieu MH ne contenant aucun agent susceptible d'être inhibiteur de la croissance de la souche en question. Les boîtesensemencées sont incubées à 37°C pendant 24h.

**V. Les combinaisons**

Dans ce travail, nous avons effectué des combinaisons à deux sur la souche *E.coli*.

Ce test consiste à combiner deux substances antibactériennes par la méthode des spots selon les CMI obtenues par celle-ci afin d'obtenir des concentrations minimales sub-inhibitrices. Pour cela, nous avons réalisé différentes dilutions volume à volume de nos échantillons dans 3ml de MH.

La lecture des résultats est réalisée après 24 heures d'incubation à 37°C.

Les combinaisons effectuées sont représentées dans le tableau suivant :

**Tableau III : Tableau représentant les différentes combinaisons effectuées dans notre étude.**

|                |                           |
|----------------|---------------------------|
| Acide lactique | HE de thym                |
| Acide lactique | HE d'eucalyptus           |
| Acide lactique | HE de la sauge            |
| HE de thym     | HE d'eucalyptus           |
| HE de thym     | HE de la sauge            |
| HE de thym     | Complexe à base d'uracile |

D'après PIBIRI (2005), les effets des combinaisons d'agents antimicrobiens, sont définis selon quatre interactions possibles :

- **Indifférence** : l'activité d'un agent antimicrobien n'est pas affectée par l'autre.

$$(A+B) = \text{Effet A ou Effet B}$$

**Addition** : l'effet de l'association est égal à la somme des effets de chaque agent étudiée isolément, à la même concentration que dans l'association.

$$(A+B) = \text{Effet A} + \text{Effet B}$$

**Synergie** : l'effet est significativement supérieur à la somme de chaque agent étudiée isolément, à la même concentration.

**(A+B) > Effet A +Effet B**

- **Antagonisme:** l'association diminue l'activité de l'un des agents antimicrobiens ou de l'autre. Elle est inférieure à la somme des effets de chacun pris séparément.

**(A+B) < Effet A +Effet B**

## *Résultats et discussions*

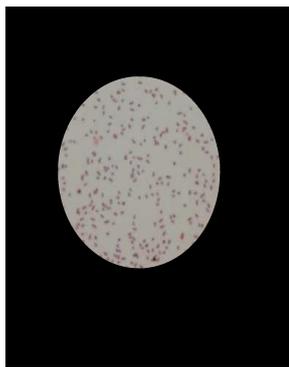
## **I. Criblage des substances antimicrobiennes (screening)**

### **I.1. Activité antibactérienne**

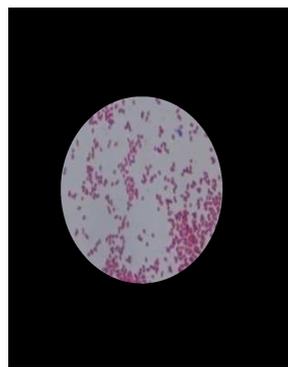
L'étude *in vitro* du pouvoir antimicrobien des agents naturels par la méthode des puits en utilisant le milieu MH pour les bactéries nous a conduits à l'obtention des résultats illustrés dans des tableaux ou figures. L'activité antibactérienne est estimée en termes de diamètre des zones d'inhibition autour des puits contenant les agents antimicrobiens à tester. Les souches sont classées en : sensibles, extrêmement sensibles ou résistantes.

Les souches utilisées ont été confirmées par une observation microscopique et la coloration de Gram réalisée sur des cellules issues de cultures jeunes obtenues sur gélose Mueller-Hinton.

Les résultats de la coloration de Gram sont illustrés par les photos présentées dans la figure 8.

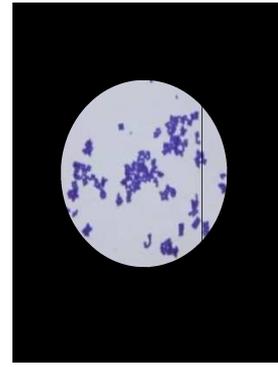


*Klebsiella.pneumoniae*



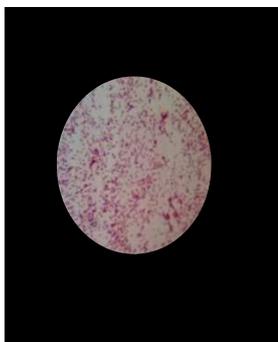
*Eschérichia.coli*

**ATCC 25923**



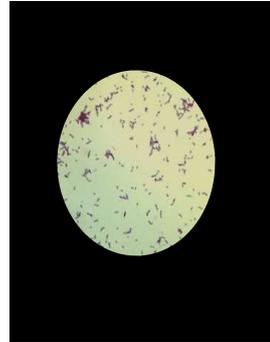
*Staphylocoque.aureus*

**ATCC 43300**

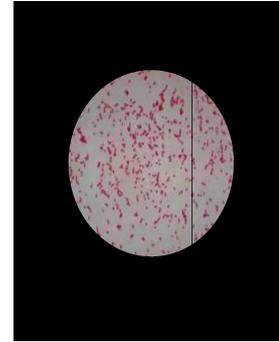


*Pseudomonas.aeruginosa*

**ATCC 27853**



*Bacillus.cereus*



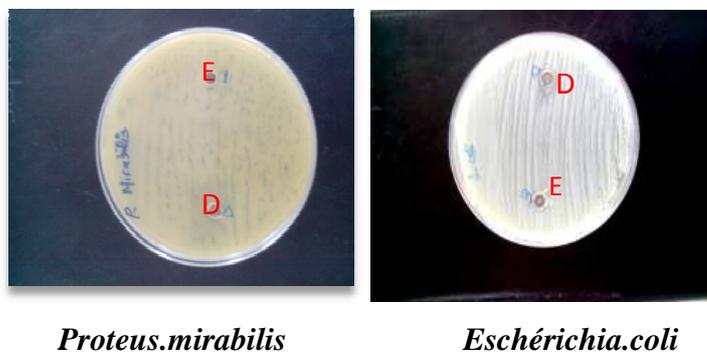
*Proteus.mirabilis*

**Figure 8:** Résultats de la coloration de Gram observée au G×1000 à l'immersion.

Les cellules d'*E.coli*, observées sous forme de coccobacilles, celles de *K.pneumoniae* en bacilles ,cellules isolées, se sont révélées Gram négatif (coloration rose), alors que les cellules de *S.aureus* se présentaient en forme de cocci , avec leur agencement particulier en grappes de raisin (coloration bleue)à Gram positif et celles de *B.cereus* en bacilles colorées en violet à Gram positif. Les cellules de *P.mirabilis* sont observées sous forme de coccobacilles (coloration rose).

### **I.1.2.Résultats du témoin négatif**

Si nos échantillons doivent être soumis aux essais biologiques, la toxicité du solvant peut également être critique car même en traces, le solvant ne devrait pas interférer dans le processus biologique. Pour cela, le DMSO ainsi que l'eau physiologique stérile ont été testés comme diluants. Les résultats (Figure 9 et Figure 10) montrent qu'ils sont appropriés et ne présentent aucun effet sur la croissance des souches microbiennes.



**Figure 9:** Effet du DMSO et de l'eau physiologique stérile sur quelques bactéries étudiées.

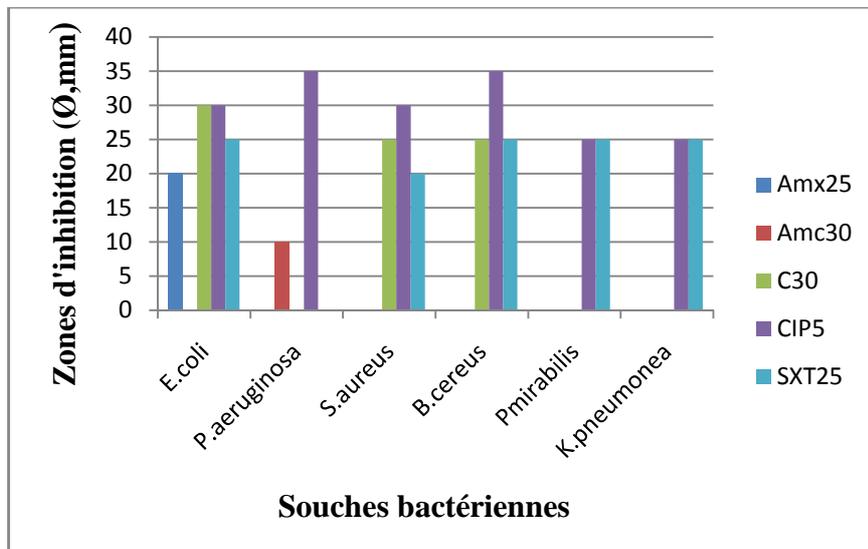


**Figure 10 :** Résultats du témoin négatif pour la méthode des puits.

### I.1.3. Résultats du témoin positif

Dans la pratique clinique quotidienne, l'efficacité antibactérienne est évaluée in vitro par la mesure de la réaction des à un agent antimicrobien dans le milieu de culture, antibiotique par exemple.

Le but de cette étape est de déterminer la sensibilité des souches testées vis-à-vis de cinq antibiotiques synthétiques, choisis par rapport à leur large spectres d'action. Cette sensibilité est exprimée par l'apparition de zones d'inhibition autour des disques. Les résultats sont représentés dans la figure10.



**Figure 11** : Représentation graphique des résultats de l'antibiogramme effectué sur les souches bactériennes choisies.

Amx25 : Amoxicilline  
clavulanique

Amc : Amoxicilline-acide

C30 : Chloromphenicol

CIP : Ciprofloxacine

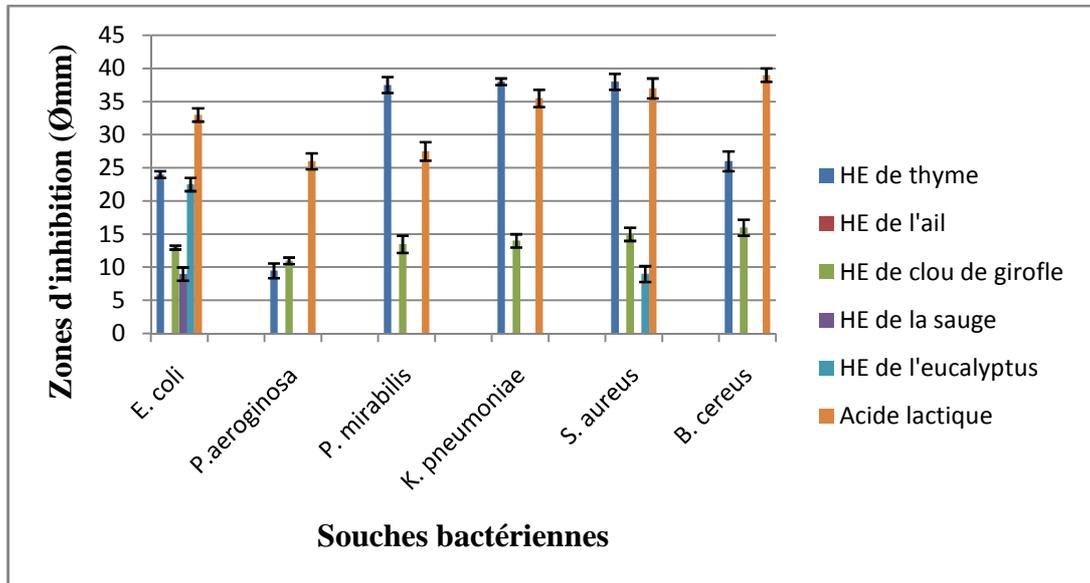
SXT25 : Sulfaméthoxazole + Triméthoprime.

En comparant les valeurs (diamètre des zones d'inhibition) de cette figure, nous remarquons que toutes les souches testées présentent une sensibilité extrême vis-à-vis de Ciprofloxacine et développent une résistance contre l'Amoxicilline et l'Amoxicilline-acide clavulanique. En outre la Sulfaméthoxazole manifeste une activité antimicrobienne contre la majorité des souches.

#### I.1.4.Effet antibactérien des six substances testées.

Dans cette partie, nous avons testé à l'état pur l'activité antibactérienne de nos cinq huiles ainsi que de l'acide lactique.

Les résultats de ce test sont représentés dans l'histogramme indiqué dans la Figure 11



**Figure12:** Représentation graphique des résultats de la méthode des puits sur les souches choisies.

Il ressort de l'histogramme présenté dans la Figure 12 que les agents antimicrobiens étudiés sont dotés d'une activité inhibitrice variable selon la bactérie testée.

Cette observation a été également rapportée par (Malecky,2006) soulignant que, les différents microorganismes n'ont pas une sensibilité similaire vis-à-vis des huiles essentielles.

Cependant, nous constatons que les souches à Gram- sont plus au moins résistantes aux HEs que les souches à Gram+. Il a été fréquemment rapporté dans la littérature (EL Kalamone et al., 2009 ; Ghilles et al ., 2009 ;Sattani et al., 2012 ;Fadli et al ., 2012) que les bactéries à Gram- résistent à l'effet inhibiteur des HEs et leurs composants. Selon Leclerc et al., (1995), cette résistance peut s'expliquer par le fait que les bactéries à Gram- possèdent une membrane externe imperméable aux substances hydrophobes, susceptibles d'entrer et empêcher la croissance bactérienne. Cependant, l'absence de cette barrière chez les Gram+ permet le contact direct des constituants hydrophobes des huiles essentielles avec la bicouche phospholipidique de la membrane cellulaire bactérienne (Burt, 2004).

Nos résultats (Figure12) montrent que *P. aeruginosa* est la souche la plus résistante vis-à-vis des HEs testées et ceci n'est pas surprenant ! Selon la littérature et les travaux menés sur les souches de cette espèce, plusieurs hypothèses ont été supposées quant à leur résistance. Selon Pibiri,(2006), cette dernière a la réputation d'être très résistante à

toutes sortes d'agents antimicrobiens et antibiotiques en général. Il est établi que l'inhibition de cette bactérie par des agents antimicrobiens, nécessite des concentrations considérables.

La sensibilité modérée des bactéries à Gram négatif vis-à-vis des huiles essentielles peut être expliquée en termes de contraintes de diffusion des composés à travers leur membrane externe causée par la présence d'une barrière hydrophile. Bien que cette barrière ne soit pas totalement imperméable, elle entrave le transport des macromolécules et des composants hydrophobes (Pierozan et al., 2009).

En effet, l'étude menée par Fodil et al. (2013) sur *Laurier nobilis* a démontrée qu'*E.coli* est d'autant plus sensible que *S.aureus* indiquant des zones d'inhibition de diamètre de 13mm et 18mm, respectivement.

Selon Delaquis et al. (2002), il est difficile de faire une généralisation du fait que chaque essence est unique dans sa composition et chaque bactérie diffère considérablement l'une de l'autre en structure et en fonctionnalité. De même, Farah et al. (2001), ont rapporté que l'efficacité antimicrobienne d'une huile essentielle est due à la nature et à la teneur de ces différents constituants qui peuvent agir en synergie.

L'HET a exhibé une activité antibactérienne remarquable pour toutes les souches bactériennes sauf pour *P.aeruginosa* avec un diamètre de 9mm qui se rapproche de celui de ciprofloxacine. Cette observation est similaire à celle de Fong et al. (2011), estimaient que le thymol et le carvacrol sont les principaux composants de l'HET à présenter cette activité antimicrobienne. Ces mêmes auteurs ont démontré que ces phénols augmentent la perméabilité de la membrane cellulaire des bactéries et réduisent la force motrice et diminuent ainsi le taux intracellulaire d'ATP qui fournit l'énergie nécessaire aux réactions chimiques et métaboliques de la cellule.

Les six souches bactériennes (Figure 12) se sont avérées sensibles à l'HE de clou de girofle avec des zones d'inhibition comprises entre 11 et 16 mm. En effet, Bourit et al. (2007) ont affirmé que les HEs à l'état pur inhibent au moins un genre bactérien. Bourit et al. (2007) ont étudié le pouvoir antibactérien des huiles essentielles des clous de girofle et sarriette sur *Salmonella.paratyphi*, et leur application à la conservation de la viande fraîche type hachée pendant une durée de 7 jours. Ces auteurs ont constaté que l'huile de clou de girofle exerce une activité antimicrobienne plus considérable que celle de sarriette. Cette dernière a ralenti la croissance de *S. paratyphi* uniquement durant les premières heures d'entreposage de la viande à une température de 1 °C. Une réduction du nombre logarithmique de cette souche en présence des HEs de sarriette et de clou de girofle est réduite d'un facteur de 4,4 et 13,19 % respectivement, jusqu'au 4<sup>ème</sup> jour où la sarriette perd complètement son activité antibactérienne, contrairement à celle du clou de girofle qui la maintient partiellement jusqu'au dernier jour.

Selon Vrinda Menon et Garg. (2001), l'HE de clou de girofle, est efficace à un niveau de 5-10µl/g pour *Listeria monocytogenes* dans des produits à base de viande.

Nos résultats montrent que *S.aureus* et *E.coli* sont les seules sensibles à l'eucalyptus. Ces résultats s'accordent avec ceux de la littérature scientifique démontrant que les

bactéries à Gram négatifs peuvent être sensibles à l'action des HEs. En effet une étude menée par

Derwich et al. (2009) sur l'effet antibactérien de l'huile d'*Eucalyptus globulus*, a montré que cette huile exerce un effet plus important sur *E.coli* que sur *S.aureus*.

Nos résultats concordent avec ceux de Khider et Sazine., 2013 où *P.aeruginosa* et *K.pneumoniae* n'ont enregistré aucun diamètre d'inhibition à l'encontre de l'HE d'*Eucalyptus camaldulensis*.

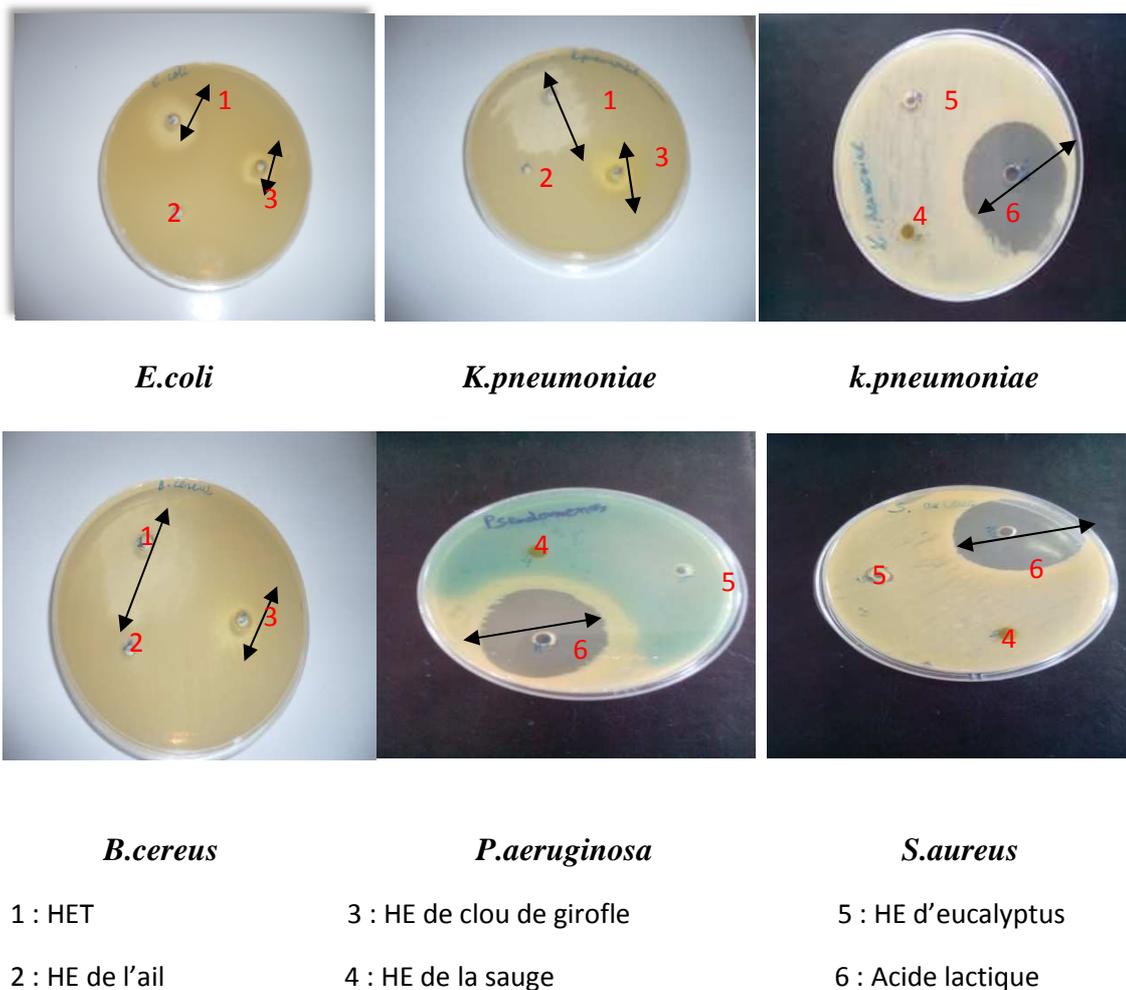
Pour l'HE de la sauge et de l'ail, nous n'avions constaté aucune action sur les souches bactériennes, sauf *E.coli* qui est légèrement sensible à la sauge avec une zone d'inhibition faible de 9mm. Ceci peut être expliqué par le fait que les molécules bioactives de ces huiles ont été détruites au cours de l'extraction des extraits aqueux des HEs.

Balouiri. (2011) a étudié l'activité antibactérienne d'un extrait de la sauge *officinalis* sur *E.coli*, *P.aeruginosa*, *B.subtilis* et *S.aureus*. Les résultats obtenus sur milieu gélosé ont permis de montrer que la sauge *officinalis* a un effet inhibiteur sur les souches sauf pour *P.aeruginosa* qui s'est avérée totalement résistante.

Khadri.(2009) a évalué l'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Allium sativum* vis-à-vis différentes souches de *P.aeruginosa* complétée par la détermination de la CMI. Les résultats ont montré que l'huile possède une action inhibitrice de la croissance sur plus de 50% des souches testées avec des CMI relativement moyennes qui varient d'une méthode à une autre dont la méthode de dilution en milieu liquide a donné des CMI entre 32 et 64µg/ml alors que celles de la méthode de dilution en milieu solide sont situées entre 64 et 128 µg/ml.

Cheradi et al. (2016) ont estimé l'activité antibactérienne du jus pur de d'*Allium sativum* sur *E.coli* ATCC 25923 ainsi que *S.aureus* ATCC 43300 (les mêmes souches utilisées dans notre étude), elles ont rapporté que ces deux souches se sont avérées extrêmement sensibles au jus pur à la concentration de 75%.

Les résultats obtenus sur l'acide lactique indiquent qu'il est très actif sur toutes les souches testées avec des zones d'inhibition supérieures à 25 mm, cette sensibilité est semblable à celle enregistrée par ciprofloxacine. Selon (Jedidi, 2007), les acides organiques ont différentes actions par exemple, telles qu'un excellent pouvoir bactéricide ou un effet bactériostatique contre les micro-organismes pathogènes se trouvant dans le tube digestif.



**Figure 13:** Effet inhibiteur par la méthode des puits.

## II. Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB).

### II.1. Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI)

La détermination des CMI des différents agents antimicrobiens testés dans cette étude a été réalisée par la méthode des spots. Cette méthode consiste à incorporer une dilution volume à volume (des volumes variables de l'agent antimicrobien à tester dans la couche superficielle du milieu de culture) a été effectuée.

Les CMI sont calculées en pourcentage (%) du volume de l'agent antimicrobien incorporé par rapport au volume de la couche superficielle du milieu de culture (3ml). Les résultats des tests sur la CMI des différents agents antimicrobiens testés sur les souches bactériennes sont rapportés dans le Tableau IV.

**Tableau IV: Valeurs des CMI des souches bactériennes exprimées en pourcentage.**

|                     | HE de thym | HE d'ail | HE de clou de girofle | HE d'eucalyptus | HE de la sauge | Acide lactique |
|---------------------|------------|----------|-----------------------|-----------------|----------------|----------------|
| <i>E.coli</i>       | 0.16%      | –        | 1%                    | 5%              | 12.6%          | 1,6%           |
| <i>P.aeruginosa</i> | 8.3%       | –        | 4.6%                  | –               | –              | 1.6%           |
| <i>P.mirabilis</i>  | 1.5%       | –        | 1%                    | –               | –              | 1.6%           |
| <i>K.pneumoniae</i> | 0.5%       | –        | 0.6%                  | –               | –              | 1.08%          |
| <i>S.aureus</i>     | 0.5%       | –        | 0.6%                  | 7.3%            | –              | 1.16%          |
| <i>B.cereus</i>     | 0.16%      | –        | 0.16%                 | –               | –              | –              |

– : non testé (échantillon non actif sur la souche).

Plus les CMI sont faibles plus l'activité antibactérienne des agents testés est meilleure.

D'après les résultats obtenus dans le Tableau IV, nous constatons que la plus faible CMI a été obtenue avec l'HET vis-à-vis d'*E.coli* et de *B. cereus*, soit 0,16%. Ce qui s'explique par la quantité infime de l'huile incorporée dans le milieu.

Cette CMI de l'HET est deux fois inférieure à celle obtenue par Ousslimani et al. (2015) vis-à-vis d'*E.coli* ATCC8739 ce qui affirme que notre souche testée est plus sensible à l'HET que cette dernière.

L'HE de clou de girofle a aussi montré une plus faible CMI vis-à-vis de *B.cereus*. La CMI de l'acide lactique étant également faible lorsqu'il est testé sur *P. aeruginosa*.

Nous pouvons déduire que l'HE de thym et de clou de girofle ainsi que l'acide lactique sont dotés d'une activité antimicrobienne très importante d'autant plus que ces derniers sont efficaces sur les six souches testées.

Tandis que la CMI la plus élevée a été enregistrée avec la sauge vis-à vis d'*E. coli*, soit 12.6 % cette dernière reste la seule souche sensible vis-à-vis cette huile.

## II.2. Concentrations Minimales Bactéricides (CMB)

Afin de déterminer la nature de l'activité antibactérienne de nos agents antibactériens testés, nous avons effectué un repiquage à partir des CMI obtenues sur le milieu MH.

Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau V.

**Tableau V: Détermination de l'effet bactéricide des différents agents antimicrobiens testés après repiquage sur le milieu MH.**

| Substances<br>Souches | HE de thym               | HE de clou de girofle    | HE d'eucalyptus        | HE de la sauge         | Acide lactique           |
|-----------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------|------------------------|--------------------------|
| <i>E.coli</i>         | <b>Effet bactéricide</b> | Effet bactériostatique   | Effet bactériostatique | Effet bactériostatique | Effet bactériostatique   |
| <i>P.aeruginosa</i>   | Effet bactériostatique   | <b>Effet bactéricide</b> | –                      | –                      | Effet bactériostatique   |
| <i>P.mirabilis</i>    | <b>Effet bactéricide</b> | <b>Effet bactéricide</b> | –                      | –                      | <b>Effet bactéricide</b> |
| <i>K.pneumoniae</i>   | <b>Effet bactéricide</b> | Effet bactériostatique   | –                      | –                      | Effet bactériostatique   |
| <i>S.aureus</i>       | Effet bactériostatique   | <b>Effet bactéricide</b> | Effet bactériostatique | –                      | <b>Effet bactéricide</b> |
| <i>B.cereus</i>       | <b>Effet bactéricide</b> | Effet bactériostatique   | –                      | –                      | Effet bactériostatique   |

– : non testé (échantillon non actif sur la souche).

Les résultats du Tableau V, révèle la nature de l'activité antibactérienne des différents agents antimicrobiens selon les souches bactériennes.

L'HE de thym, l'HE de clou de girofle ainsi que l'acide lactique sont dotés d'un fort pouvoir en raison de leur effet inhibiteur sur les souches testées.

## III. Effets des combinaisons des substances étudiées:

Les HEs peuvent être utilisées comme agents antimicrobiens contre des espèces pathogènes pour l'Homme. Afin de réduire la dose efficace de ces agents, celles-ci peuvent être combinées avec d'autres agents ce qui peut donner naissance à un effet synergique ou additif (Horvath et al., 2016).

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'efficacité des huiles essentielles végétales en combinaison à deux avec d'autres agents microbiens. Les mélanges obtenus sont testés par la méthode des spots sur la souche *E.coli*.

### III.1. Acide lactique/HEs

#### III.1.1. Acide lactique versus HE de thym

Les résultats du Tableau VI montrent les résultats de la combinaison de deux agents antimicrobiens : HE de thym et l'acide lactique sur la souche *E.coli*.

**Tableau VI: Résultats du test de combinaison Acide lactique versus HE de thym.**

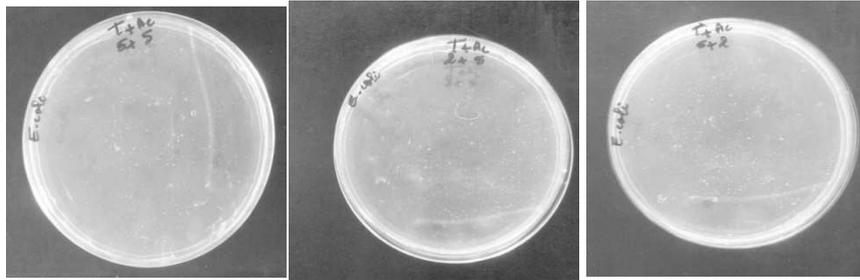
| Al \ HET | 0.25%                 | 0.16%*                | 0.083%                | 0.05%                 | 0.03%                 |
|----------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 2%       | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> |
| 1.6%*    | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> |
| 1.3%     | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> |
| 1%       | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> |
| 0.6%     | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> |
| 0.3%     | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> |
| 0.16%    | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> |

**In<sub>T</sub>** : Inhibition totale

\* : CMI

D'après les résultats du tableau VI, on constate que les bactéries se sont montrées sensibles à toutes les concentrations donc l'effet antibactérien de la combinaison est plus important en le comparant à l'effet de l'huile essentielle et l'acide lactique testés séparément.

Lors d'une combinaison de substances antimicrobienne, trois effets sont à distinguer : addition, antagonisme ou synergie (Fleiro, 2011). Nous avons obtenu une inhibition totale à des concentrations (sub-inhibitrices) inférieures aux CMI des agents antimicrobiens testés, ce qui indique probablement l'effet synergique.



**HE de thym+acide lactique 0.08%+0.16%**    **HE de thym+acide lactique 0.03%+0.016%**    **HE de thym+acide lactique 0.08%+0.06%**

**Figure 14** : Photos illustrant l'effet inhibiteur de la combinaison : Acide lactique avec l'HE de thym.

### III.1.2. Acide lactique versus HE d'eucalyptus

Les résultats du Tableau VII révèlent l'effet de la combinaison de l'acide lactique avec l'HE d'eucalyptus sur la souche *E. coli*.

**Tableau VII: Résultats du test de combinaison Acide lactique versus l'HE d'Eucalyptus**

| HEE \ AI | 2%              | 1.6%*           | 1.3%            | 1%              | 0.6%            | 0.3%            | 0.16%           |
|----------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 6%       | In <sub>T</sub> |
| 5.6%*    | In <sub>T</sub> |
| 5.3%     | In <sub>T</sub> |
| 5%       | In <sub>T</sub> |
| 4.6%     | In <sub>T</sub> |
| 4.3%     | In <sub>T</sub> |
| 4%       | In <sub>T</sub> |
| 3.3%     | In <sub>T</sub> |
| 3%       | In <sub>T</sub> |
| 2.6%     | In <sub>T</sub> |

**In<sub>T</sub>** : Inhibition totale

**\*** : CMI

Nous avons réalisé des associations entre l'acide lactique et l'HE d'eucalyptus à de différentes concentrations.

D'après les résultats du Tableau VII, *E.coli* a montré une sensibilité à toutes les variations de doses, et même nous avons pu obtenir une inhibition totale à des concentrations inférieures aux au de-sous de leurs CMI, ceci se traduit par un effet synergique probable entre les deux substances.



**Acide lactique+HE d'eucalyptus**

**0.16%+3.3%**



**Acide lactique+HE d'eucalyptus**

**0.16%+2.6%**

**Figure 15:** Photos illustrant l'effet inhibiteur de la combinaison Acide lactique avec l'HE d'eucalyptus

### III.1.3. Acide lactique versus HE de sauge

Les résultats du Tableau VIII représentent l'effet de la combinaison de l'acide lactique avec l'HE de la sauge.

**Tableau VIII: Résultats de la combinaison Acide lactique versus HE de la sauge.**

| HES \ AI | 2%                    | 1.6%*                 | 1.3%                  | 1%                    | 0.6%                  | 0.3%                  | 0.16%                 |
|----------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 13.3%    | <b>In<sub>T</sub></b> |
| 12.8%*   | <b>In<sub>T</sub></b> |
| 12%      | <b>In<sub>T</sub></b> |
| 11.6%    | <b>In<sub>T</sub></b> |
| 10%      | <b>In<sub>T</sub></b> |
| 9.6%     | <b>In<sub>T</sub></b> |
| 8.33%    | <b>In<sub>T</sub></b> |
| 7.33%    | <b>In<sub>T</sub></b> |
| 6.6%     | <b>In<sub>T</sub></b> |
| 6%       | <b>In<sub>T</sub></b> |
| 5%       | <b>In<sub>T</sub></b> |

D'après les résultats du Tableau VIII, nous pouvons déduire que les souches d'*E.coli* sont extrêmement sensibles à la combinaison Acide lactique/HE de sauge par rapport à l'effet de l'huile essentielle et l'acide lactique testés séparément. L'inhibition totale se poursuit à des doses inférieures aux CMI ce qu'explique l'effet synergique.

Nous avons même pu avoir une inhibition totale avec cette combinaison et diminuer les concentrations jusqu'à 5% pour l'HE de la sauge et 0.16% pour l'acide lactique.

Généralement, les bactéries deviennent plus sensibles aux HEs à des pH faibles. L'hydrophobicité d'une huile essentielle augmente avec l'augmentation de l'acidité ce qui lui permet de se dissoudre plus facilement dans les lipides de la paroi cellulaire des microorganismes (Rasooli, 2007).

Selon Michiel et al. (2007), à pH bas les molécules de thymol et carvacrol, qui constituent les composés majeurs de l'HE de thym, sont sous forme indissociée et hydrophobe ce qui conduit à une meilleure association avec le côté hydrophobe des protéines donc, une bonne accumulation dans la phase lipidique de la membrane des cellules qui est le siège de beaucoup d'interactions métaboliques.

D'après KO et al. (2015), il est possible de réduire les contaminations à *E.coli* sur une surface de viande bœuf en combinant l'HE de thym et l'acide lactique. En outre Soykan et al. (2015) ont démontré un effet synergique de la combinaison de l'huile essentielle de cannelle, de l'origan et l'acide acétique sur les pois en aérobie.

Moon et al. (2016) ont examiné les effets antimicrobiens de sauce de soja contre *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella Typhimurium*, et *Listeria monocytogenes*. Pour cribler une variété d'effets combinés, la sauce de soja a été mélangée avec : le thymol, l'eugénol, de l'acide  $\beta$ -résorcylique et la vanilline.

La sauce combinée avec carvacrol et thymol a induit la plus grande activité antibactérienne contre toutes les bactéries testées, alors qu'aucune de ces substances n'a montré une activité bactéricide lorsqu'elles sont utilisées séparément. Ces résultats suggèrent que le carvacrol et le thymol agissent en synergie avec d'autres facteurs présents dans la sauce de soja ce qui augmente l'activité antimicrobienne contre les principaux agents pathogènes d'origine alimentaire. La synergie est attribuée à la combinaison de deux facteurs (concentration principalement élevée en sel et un pH faible conféré par des acides organiques) présents dans la sauce.

Toute fois l'efficacité de la combinaison des HEs et des acides organiques pourrait être considérée comme une alternative intéressante pour l'industrie alimentaire du fait que les concentrations inhibitrices sont réduites ce qui évitera l'altération de la qualité organoleptique des aliments.

### III.2. HE /HE

Nous avons examiné l'activité antimicrobienne des combinaisons HE/HE avec la méthode des spots en variant les doses de chaque huile essentielle pour déterminer la nature de l'effet.

• **III.2.1. HE de thym versus HE d'eucalyptus**

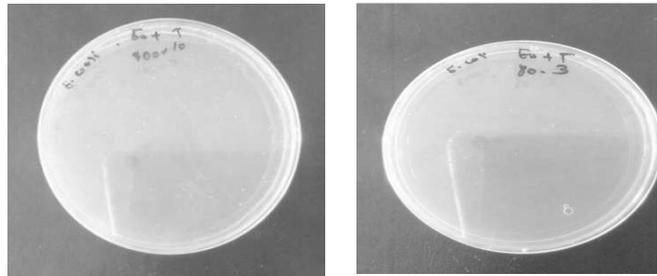
Les résultats du tableau IX montrent l'effet inhibiteur de la combinaison de l'HE de thym avec l'HE d'eucalyptus.

**Tableau IX: Résultats de la combinaison du thym versus HE d'eucalyptus.**

| HET<br>HEE | 0.25%           | 0.16%*          | 0.083%          | 0.05%           | 0.03%           |
|------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 6%         | In <sub>T</sub> |
| 5.6%*      | In <sub>T</sub> |
| 5.3%       | In <sub>T</sub> |
| 5%         | In <sub>T</sub> |
| 4.6%       | In <sub>T</sub> |
| 4.3%       | In <sub>T</sub> |
| 4%         | In <sub>T</sub> |
| 3.3%       | In <sub>T</sub> |
| 3%         | In <sub>T</sub> |
| 2.6%       | In <sub>T</sub> |

Il ressort du Tableau IX que la combinaison HE de thym/ HE d'eucalyptus a exercé un effet inhibiteur contre *E.coli* à tous les stades de concentration et nous avons diminué ces dernières jusqu'à 0.03% pour l'HE de thym et à 2.6% pour l'HE d'eucalyptus au dessous de CMI. Ceci a conduit à un effet synergique dû probablement aux interactions chimiques entre les composants majeurs de ces deux HEs. Ces résultats sont similaires à ceux publiés par Moon et al. (2016) qui expliquaient l'effet antibactérien du mélange thymol avec le carvacrol contre *Escherichia coli* O157 qui agit sur la paroi bactérienne des Gram-. De même Horvath et al. (2016) ont étudié l'effet synergique de la combinaison des HEs de : thym, la cannelle, clou de girofle et menthe

verte contre les levures et les moisissures et ils ont pu diminuer leurs doses par ces associations. En outre l'effet synergique apparait aussi entre les huiles essentielles de l'origan mexicain, moutarde (*Brassicainigra*), et le thym (*Thymus vulgaris*) qui ont été évalués en combinaisons binaires contre *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, ou *Salmonella enteritidis* (Reyes-Jurado. 2016).



**HE de thym+HE d'eucalyptus    HE de thym+HE d'eucalyptus**

**0.16%+3.3%**

**0.03%+2.6%**

**Figure 16:** Photos illustrant l'effet inhibiteur de la combinaison HE de thym avec l'HE d'eucalyptus.

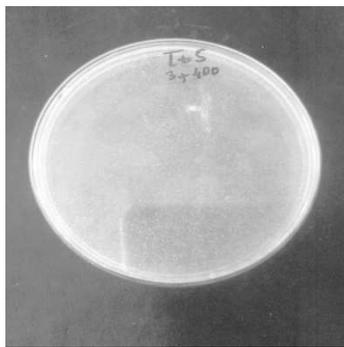
- **HE de thym versus HE de la sauge**

Les résultats du Tableau X montrent le pouvoir antibactérien qu'exerce la combinaison de l'HE de thym avec l'HE de la sauge contre les souches d'*E.coli*.

| <b>HES \ HET</b> | 0.25%                 | 0.16*%                | 0.083%                | 0.05%                 | 0.03%                 |
|------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 13.3%            | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> |
| 12.6%*           | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> |
| 12%              | <b>C<sub>R</sub></b>  | <b>C<sub>R</sub></b>  | <b>C<sub>R</sub></b>  | <b>C<sub>R</sub></b>  | <b>C<sub>R</sub></b>  |
| 11.6%            | <b>C<sub>R</sub></b>  | <b>C<sub>R</sub></b>  | <b>C<sub>R</sub></b>  | <b>C<sub>R</sub></b>  | <b>C<sub>R</sub></b>  |
| 10%              | <b>C<sub>R</sub></b>  | <b>C<sub>R</sub></b>  | <b>C<sub>R</sub></b>  | <b>C<sub>R</sub></b>  | <b>C<sub>R</sub></b>  |
| 9.6%             | <b>C<sub>R</sub></b>  | <b>C<sub>R</sub></b>  | <b>C<sub>R</sub></b>  | <b>C<sub>R</sub></b>  | <b>C<sub>R</sub></b>  |
| 8.33%            | <b>C<sub>R</sub></b>  | <b>C<sub>R</sub></b>  | <b>C<sub>R</sub></b>  | <b>C<sub>R</sub></b>  | <b>C<sub>R</sub></b>  |
| 7.33%            | <b>C<sub>R</sub></b>  | <b>C<sub>R</sub></b>  | <b>C<sub>R</sub></b>  | <b>C<sub>R</sub></b>  | <b>C<sub>R</sub></b>  |
| 6%               | <b>C<sub>R</sub></b>  | <b>C<sub>R</sub></b>  | <b>C<sub>R</sub></b>  | <b>C<sub>R</sub></b>  | <b>C<sub>R</sub></b>  |

**C<sub>R</sub>** : Croissance bactérienne

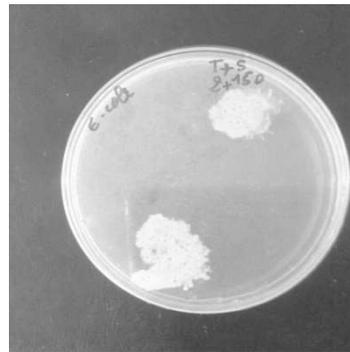
Les résultats du Tableau X indiquent que la combinaison HE de thym avec l'HE de la sauge exerce un effet inhibiteur contre les souches d'*E.coli* à des concentrations supérieures à celles des CMI des deux huiles essentielles cela s'explique par l'effet additionnel. Ces résultats sont similaires à ceux de Guetierrez et al. (2008) portant sur la recherche de nouvelles substances actives qui peuvent surmonter le problème des infections bactériennes d'origine alimentaire. Les substances utilisées comme modèles étaient les HEs de thym et de sauge qui présentaient un effet additif contre *L.monotocytogenese*



Effet inhibiteur

**HE de thym+HE de la sauge**

**0.05%+13.3%**



Croissance bactérienne

**HE de thym+HE de la sauge**

**0.03%+5%**

**Figure 17:** Photos illustrant l'effet de la combinaison de l'HE de thym avec l'HE de la sauge.

### **III.3. HE versus complexe chimique**

Les résultats de la combinaison de l'HE de thym avec le complexe chimique ont été rapportés dans le Tableau XI.

**Tableau XI:** Tableau représentant les résultats de la combinaison de l'HE de thym avec le complexe chimique.

|                   |                       |                       |                       |                       |                       |
|-------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| <b>HET</b>        | 0.25%                 | 0.16%*                | 0.083%                | 0.05%                 | 0.03%                 |
| <b>C.chimique</b> |                       |                       |                       |                       |                       |
| 0.83%             | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> |
| 0.66%*            | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> |
| 0.5%              | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> |
| 0.33%             | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> |
| 0.16%             | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> |
| 0.1%              | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> | <b>In<sub>T</sub></b> |

Nous avons réalisé un mélange contenant l'HE de thym et un complexe chimique doté d'une activité antimicrobienne avec la méthode des spots. Ensuite, nous avons testé l'activité antibactérienne du mélange.

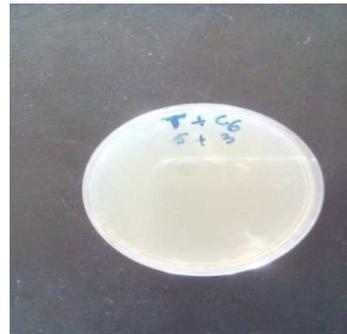
Les résultats du Tableau XI montrent un pouvoir inhibiteur de la combinaison HE de thym/ complexe chimique même à des concentrations inférieures à leurs CMI qui traduit la présence d'un effet synergique et que l'activité des complexes chimiques est améliorée en présence de l'HE de thym.

Cela peut être expliqué par la formation de nouvelles molécules lors de la combinaison auxquelles les germes ne sont pas encore adaptés ce qui règle le problème de la résistance (Musiol, et al., 2014). Ces résultats suggèrent le potentiel des mélanges étudiés pour inhiber la croissance microbienne et la conservation des aliments. Cependant, leur effet sur la qualité sensorielle des aliments compatibles avec leurs besoins de saveur est à évaluer.



**HE de thym +complexe chimique**

**0.25%+0.16%**



**HE de thym +complexe chimique**

**0.08%+0.16%**

**Figure 18** : Photos illustrant l'effet inhibiteur de la combinaison : HE de thym avec le complexe chimique.

### **Conclusion et perspectives**

En raison du souci croissant des consommateurs aux denrées contenant de tels additifs chimiques, la recherche des additifs naturels a notamment augmenté ces dernières années.

La présente étude vise à évaluer de façon comparative l'activité antibactérienne de cinq extraits végétaux ainsi qu'avec l'acide lactique. Puis, réaliser des combinaisons entre les substances bioactives ainsi qu'avec un complexe chimique à base d'uracile afin de renforcer leur activité antimicrobienne.

Il ressort de nos résultats que les six souches bactériennes sont extrêmement sensibles à l'HET et l'acide lactique, moyennement sensibles à l'égard de l'HE du clou de girofle.

*E.coli* est la seule sensible à la sauge, elle présente aussi une extrême sensibilité en vers l'HE d'eucalyptus suivie de *S.aureus* qui est légèrement sensible à l'égard de cette dernière. Toutefois, l'HE de l'ail semble être inactive sur les six souches étudiées.

En outre, la combinaison de l'HET avec l'acide lactique testé sur *E. coli* a montré un effet synergique. En effet, l'association a permis la réduction des concentrations de l'huile et de l'acide de 80% et de plus de 90% respectivement.

La combinaison de l'HET avec l'HE d'eucalyptus a montré également un effet synergique : la réduction de leur concentration de 80% et 53% respectivement. Également l'association de l'HET avec l'HE de la sauge a présenté un effet synergique.

A l'essor de la présente étude, il serait intéressant de mener une étude plus approfondie en considérant les aspects suivant :

- ✓ Tester les mêmes substances sur d'autres bactéries de la flore intestinale ainsi que sur les bactéries pathogènes impliquées dans la détérioration des aliments.
- ✓ Etudier l'effet de combinaison de ces huiles avec les antibiotiques afin de renforcer leurs activités.
- ✓ Tester ces combinaisons sur des matrices alimentaires.

- ✓ Il serait, également très intéressant d'élargir l'utilisation des combinaisons à l'échelle industrielle en les adoptants comme additifs pour conserver les denrées alimentaires.
- ✓ Utiliser ces combinaisons dans le domaine pharmaceutique et cosmétique.

## *Conclusion et perspectives*

En raison du souci croissant des consommateurs aux denrées contenant de tels additifs chimiques, la recherche des additifs naturels a notamment augmenté ces dernières années.

La présente étude vise à évaluer de façon comparative l'activité antibactérienne de cinq extraits végétaux ainsi qu'avec l'acide lactique. Puis, réaliser des combinaisons entre les substances bioactives ainsi qu'avec un complexe chimique à base d'uracile afin de renforcer leur activité antimicrobienne.

Il ressort de nos résultats que les six souches bactériennes sont extrêmement sensibles à l'HET et l'acide lactique, moyennement sensibles à l'égard de l'HE du clou de girofle.

*E.coli* est la seule sensible à la sauge, elle présente aussi une extrême sensibilité en vers l'HE d'eucalyptus suivie de *S.aureus* qui est légèrement sensible à l'égard de cette dernière. Toutefois, l'HE de l'ail semble être inactive sur les six souches étudiées.

En outre, la combinaison de l'HET avec l'acide lactique testé sur *E. coli* a montré un effet synergique. En effet, l'association a permis la réduction des concentrations de l'huile et de l'acide de 80% et de plus de 90% respectivement.

La combinaison de l'HET avec l'HE d'eucalyptus a montré également un effet synergique : la réduction de leur concentration de 80% et 53% respectivement. Egalement l'association de l'HET avec le complexe chimique a montré un effet synergique : réduction de leur concentration de 88% et 86 % respectivement.

A l'essor de la présente étude, il serait intéressant de mener une étude plus approfondie en considérant les aspects suivant :

- ✓ Tester les mêmes substances sur d'autres bactéries de la flore intestinale ainsi que sur les bactéries pathogènes impliquées dans la détérioration des aliments.
- ✓ Etudier l'effet de combinaison de ces huiles avec les antibiotiques afin de renforcer leurs activités.
- ✓ Tester ces combinaisons sur des matrices alimentaires.
- ✓ Il serait, également très intéressant d'élargir l'utilisation des combinaisons à l'échelle industrielle en les adoptants comme additifs pour conserver les denrées alimentaires.
- ✓ Utiliser ces combinaisons dans le domaine pharmaceutique et cosmétique.

## *Références bibliographiques*

- **ADAMS T. (1989).** Identification of Oils by Tap Mass Spectrometry Academic Press, New York.
- **AKINPELU DA, ODEWADE JO, AIYEGORO, ASAFA AO, AKINPELEU OF, AGUNBIADE MO.(2016).** Biocidaleffects of stem barkextract of *Chrysophyllum albidum* G. Don on vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. BMC Complement Altern Med: 10.1186/s12906-016-1080-6.
- **ALAN L ., MILLER N.D. (1996).** Antipxydant flavonoides, function and clinical usage. *Alternative Medecine, Review.* **1(2)** : 4-10.
- **AMIOT J. (2005).** *Thymus vulgaris*, un cas de polymorphisme chimique pour comprendre l'écologie évolutive des composés secondaires. Thèse de doctorat, école nationale supérieure d'Agronomie de Montpellier.
- **AMMOR M. (2004).** Ecosystèmes microbiens d'un atelier fermier de salaison : identification et propriétés des produits laitiers.
- **ANONYME. (2007).** Recueil des normes françaises sur les huiles essentielles : 2<sup>ème</sup> édition. AFNOR. Paris.
- **ARBONNIER M. (2009).** Arbres, Arbustes et Lianes des Zones Sèches d'Afrique de l'Ouest (3<sup>ème</sup> edn). Ed. CNRS : Paris.
- **ARCHAMBAUD M. (2009).** familles. Laboratoire Bactériologie-Hygiène. CHU Rangueil Toulouse.
- **ARNUACHLAM K., ASCENIO SD., SOARE .IM, SOUZA-AGUIAR RW., DA SILVA LI ., OLIVEIRA RG., BALOGUN SO., OLIVEIRA MARTINS DT.(2016)** *Gallesia integrifolia* (Spreng.) Harms: In vitro and in vivo antibacterial activities and mode of action. *J. Ethnopharmacology.* 26;184:128-37. doi: 10.1016/j.
- **AVRIL J-L ., FAUCHERE J-L . (2002).** Bactériologie générale et médicale. Ed Ellipses. P : 141.
- **AZEREDO G.A., STAMFORD T.L.M., MUNES P.C., NETO N J.G., OLIVEIRA MEG. ; SOUZA E.L. (2011).** Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L and *Rosmarium officinalis* L to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables *Food Research International*, 44, 1541-1548.
- **BACHELOT C., BLAISE A., CORBEL T., LE GUERNIC A. (2006).** Les huiles essentielles. U.C.O Bretagne Nord. Licence 2 Biologie, Option travail d'étude.
- **BAG A, CHATTOPADHAY RR. (2015).** Evaluation of Synergistic Antibacterial and Antioxidant Efficacy of Essential Oils of Spices and Herbs in Combination. 10(7):e0131321.
- **BAGAMBOULA C.F., UYTENDAELE M. AND DEBEVERE J. (2004).** Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *higella sonnei* and *S. flexneri*, *Food Microbiology*, p. 33.
- **BAKALI F., AVERBECK S., et al (2008).** Biological effects of essential oils, A review .*Food and Chemical Toxicologie* 46: 446-475.

- **BALOUIRI M. (2011).** Contribution à l'étude de l'activité antibactérienne de trois extraits de plantes médicinales et aromatiques cultivées dans le jardin de l'institut national des plantes médicinales et aromatiques-Taounate. Thèse de Master, Université Sidi Mohammed Ben Abdellah, Algérie.
- **BASSOLE I.H.N., LAMIEN-MEDA A., BAYALA B., OBAME L.C., ILBOUDO A.J., FRANZ C., NOVAK J., NEBIE R.C., DISKO M.H. (2011).** Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon citrates* and *Cymbopogon giganteus* essential oils alone and in combination. *Phytomedicine*, 18, 1070-1074.
- **BASSOLE I.H.N., LAMIEN-MEDA A., BAYALA B., TIROGO S., FRANZ C., NOVAK J., NEBIE R.C., DISKO M.H. (2010).** Composition and antimicrobial activities of *Lippia multiflora* Moldenke, *Mentha x piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. Essential oils and their major monoterpenes alcohols alone and in combinaison. *Molecules*, 15, 7825-7839.
- **BAUDOUX D. (2000).** L'aromathérapie : se soigner par les huiles essentielles. Edition Atlantica.
- **BENKIKI N. (2006).** Etude phytochimiques des plantes médicinales Algérienne : *Ruta montana*, *Matricaria pubescences* et *Hypericum perforiatum* Thèse de Doctorat. Université de BATNA.
- **BENBELKACEM N. (2012).** Synthèse et caractérisation de complexes mixtes de cobalt (III) avec l'éthylènediamine, une série d'acides aminés et de bases azotées. Thèse de magister. Université Mouloud Mammeri. Tizi-Ouzou, Alger. 14.
- **BERTIN Y. (2012).** Utilisation d'acides organiques contre *salmonella* dans les produits carnes et de la volaille.
- **BIANCHINI F, VAINIO H. (2001).** *Allium* vegetables and organosulfur compounds: do they help prevent cancer. *J. Environ Health Perspect*, 109(9):893-902.
- **BILGRAMI K.S., SINHA A.K., (1992).** Inhibition of aflatoxin production and growth of *Aspergillus flavus* by eugenol, onion and garlic extracts. *Indian. J. Medical Research*. 96: 171-175.
- **BLOCK E (1992).** The organo sulfur chemistry of the genus *Allium*. Implications for the organic chemistry of sulphur. *Angew. Chemistry International Edition*, 31 (9) 1135-1178.
- **BOIZOT N., and ChARPENTIER .J.P. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre foustier. *Le cahier des techniques de l'Inra*. 79-82. (cited in DjemaiZoueglache S, 2008).
- **BOUQUET A. (1972).** Plantes médicinales du Congo-Brazzaville : *Uvariopsis*, *Bauriantha*, *Diospyros*, *ORTOM*, Paris, P. 1-40.
- **BOURIT S., BOUSSAD N. (2008).** Détermination in vitro du pouvoir antibactérien des huiles essentielles d'Eucalyptus, Myrte, Clou de girofle, et Sarriette et leur application à la conservation de la viande fraîche type hachée. Thèse d'ingénieur de l'Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou, Alger, 66-71.
- **BRAVO L., (1998).** Polyphenols : chemistry, dietary sources, métabolisme, and nutritional signifiante ; nutrition reviews ; 56(11) : 317-333.

- **BRUNETON J. (2009).** *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales* (4eme edn). Tec & Doc Lavoisier : Paris.
- **BRUNETON J. (1999).** *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Techniques et Documentations Lavoisier*
- **BRUNKE E.J., HAMMERS HMIDIT F. J et SCHMAUS G. (1993).** Analyses "head space" de plantes médecinales, Parfums cosmétiques aromes, 10,45-56.
- **BUCHET R., SANDORFY C. (1983).** *Journal of Physic Chemistry*, 87-275.
- **BURT S. (2004).** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods *.International Journal of food Microbiology*.94, 223-253
- **CAILLET S., Lacroix M. (2007).** Les huiles essentielles : Leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire ; laboratoire de Recherche en Science Appliquées à l'Alimentation (RESALA) de l'INRS. Institut Armand-Frappier, Université de Laval (Québec).
- **CARRION-GRANDA X., FERNANDEZ-PAN I., JAIME I., ROVIRA J., MATE JI. (2016).** Improvement of the microbiological quality of ready-to-eat peeled shrimps (*Penaeus vannamei*) by the use of chitosan coatings. *Food Microbiol.* 232,144-149
- **CATIZONE P., MAROTTI M., TODERI G. & TETENYI P., 1986.** *Coltivazione delle piante medicinali e aromatiche.* Pàtron Editore, Bologna, 399 p.
- **CEYLAN E., FUNG D.Y.C. AND SABAH J.R. (2004).** Antimicrobial activity and synergistic effect of cinnamon with sodium benzoate or potassium sorbate in controlling *Esherichia coli* O157:H7 in apple juice. *Journal of Food Sciences* ,69: pp.102-106.
- **CHAN W T., ESPINOSA M ., (2016).** The *Streptococcus pneumoniae* pezAT Toxin-Antitoxin System Reduces Lactam Resistance and Genetic Competence. *Front Microbiol* 25; 7: 1322.
- **CHARPENTIER J.P. and BOIZOT N. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénolique des organes d'un arbre forestier. Amélioration génétique et physiologie forestière, *INRA* , 79. Pp : 10-15.
- **CHENE C. (2002).** Les acides organiques. [www.scribd.com](http://www.scribd.com).
- **CHEREADI D. SARNI C. (2016).** Évaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux d'ail (*Allium sativum*) et son application pour la conservation de la viande fraîche de dinde. Thèse de master, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, Alger, 48.
- **COWAN M-M (1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews.* 12 (4): 564 582.
- **CONNER D. E. (1993).** Naturally occurring compounds. In Davidson P. M., Branen A.L.
- **COXS. D., MANN C.M MARKHAM J. L., BELL H.C., GUSTAFSON J.E., WARMINGTON. J. R et WYLLIE S.G. (2000).** The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Malaleuca alternifila* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology* 88: 170-175.

- **CRISTIANI M., DIARNIGO M., MANDALARI G., CASTELLI F., SARPIETRO M. G et MICILI D. (2007).** Interaction of four monoterpenes contained in essential oils.
- **DABAH R., EDWARDS VM., MOATS WA. (1970).** Antimicrobial action of some citrus fruit oils on selected food-borne bacteria. *Applied Microbiol.* 19, 27-31.
- **DALET K., BRIAND C., CENATIEMPO Y. and HECHARD Y. (2000).** The rpoN gene of *Enterococcus faecalis* directs sensitivity to subclass IIa bacteriocins. *Curr. Microbiol.*, **41**(6), 441-443.
- **DANOUNE K., DZIRI F. (2008).** Etude des effets des huiles essentielles de menthe et thym et de leurs interactions sur certaines bactéries pathogènes de la viande. Thèse d'ingénieur de l'Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou, Alger, 103.
- **DEEGAN L.H., COTTER P.D., HILL C. ET ROSS P. (2006).** Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.*, **16**: 1058-1071.
- **DEGRYSE A-C, DELPA I, VOINIER M-A (2008).** Atelier santé environnement: risques et bénéfices possibles des huiles essentielles-IGS-EHESP.
- **DELAMARE S. (2014).** Université Rouen-UFR Médecine et Pharmacie.
- **DELAQUIS PJ., STANICK K., GIRARD B., MAZZA G. (2002).** Antimicrobial activity of individual and mixed fraction of Dill, Cilantro, Coriander and Eucalyptus Essential oils. *Int. Journal of Food Microbiology*, **74**, 101-109.
- **DELARRAS C. (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Edition TEC & DOC. Lavoisier.
- **DERWICH E., BENZIANE Z., BOUKIR A. (2009).** GC /MS Analysis of Volatile Constituents and Antibacterial Activity of essential oil of Leaves of *Eucalyptus globulus* in Atlas Median from Morocco *Advances in Natural and applied Sciences* ,**3**(3), 305-313.
- **DJERROUMI A., et NACEF M. (2004).** 100 plantes médicinales d'Algérie. Ed *Palais du livre* 135 -131.
- **DJIDEL A. (2007).** Production d'acide lactique par *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* sur jus de datte : Cinétique et optimisation des cultures discontinues, semi-continues. Thèse de doctorat . Institut National Polytechnique de Lorraine. 217.
- **DORANTES., COLMENDRO R., HERNANDEZ H., MOTAL., JARAMILLO M.E., FERNADEZE. Et SOLANO C. (2000).** Inhibition of growth of sane food borne pathogenic bacteria by capsicum annum extracts. *International Journal Food Microbiology*, **57**, 125-128.
- **DORTU C., THONART, Ph. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, vol. **13**, n° **1**, p. 143-154.
- **DROMAN H. J. D et DEANS S.G (2000).** Antimicrobial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, **88** (2), 308-316.
- **DULING E.N., OWEN J.C., JOHN B.G., Rosmary F.W., KEVIN A.M., YEAP L.F., ET NIGEL B.P. (2007).** Extraction of phenolic and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol-water mixture. *Food chemistry.*, **101** : 1417- 142

- **EKLUND T. (1989)**. Organic acids and esters. In: Gould, G.W. (Ed.), Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures, *Elsevier Applied Science*, London, pp. 161-200.
- **ENDO H., HIROTA M., ITO Y., TAKEUCHI T., HAMADA Y. (1982)**, *Bull. Chem. Soc. Japan.* 55-1564.
- **EVANDRO L. S, JEFERSON C.B. MARIA L.C. NELSON J.G.N. ANA C.V.C (2009)**. Combined application of *origanum vulgare* essential oil and acetic acid for controlling the growth of *staphylococcus aureus*, Brazilian journal of microbiology.
- **FABRE MC ., GENIN A., MERIGOUX J .,MOGET E. (1992)**. HERBORISTERIE FAMILILALE ,53.
- **FARAH A. (2001)**. Composition chimique et activité antibactérienne et antifongique des huiles essentielles extraites des feuilles d’*Eucalyptus calaldulensis* et son hybride naturel (clone 583).*Acta Botanica Gallica*,148 (3),183-190.
- **FAY M., WILBUR S., ABADIN H., INGERMAN L., SWARTS S. G., RESEARCH S. (2005)**. Toxicological Profile for Nickel. Ed, U.S. p: 1-185.**Foda M.I., El-Sayed M.A., HASSAN A.A., RASMY N.M. and El-MOGHAZY M.M(2010)**. Effect of spearmint essential oil on chemical composition and sensory properties of white cheese. *Journal of American Science*; 6 (5): pp. 272-280.
- **FODIL R ., KECHIR S. (2013)**. Les méthodes alternatives pour la bio conservation de la viande fraiche bovine. Thèse de master de l’Université de Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou, Alger ,16-27.
- **FONG D. GAULIN C.,ME-LINH LE,SHUM M (2011)**. Efficacité des agents antimicrobiens de substitution pour la desinfection des surfaces dures , national collaborating center for environmental health .
- **FRANCHOMME P. (1996)**. L’aromathérapie exactement, Nouvelles edition Jollis, Lomoges.
- **FRANCHOMME P. ET PENOËL D. (2001)**. Comparaison en sept points entre les antibiotiques et les huiles essentielles. De l’aromathérapie.232,233-448.
- **FROEICH, S., SCHUBERT, C., BIENZLE, U., JENETT-SIEMS, K., (2005)**. In vitro antiplasmodial activity of prenylated chalcone derivatives of hops (*Humulus lupulus*) and their interaction with hemin *Journal of Antimicrobial Chemother.* 55, 883–887.
- **GAHAMI M. A. EL., KHAFAGY Z. A., ALI A. M., ISMAIL N. M. (2004)**. *Journal of Inorganic Organometallic polymers*, 14.
- **GERO M., AYOTUNDE S. , INUA B., BABAKURA M., SULE ALIYU M. , GILL A.O. ET HALLEY R.A. (2003)**. Interactive inhibition of meat spoilage and pathogenic bacteria by lysozyme nisin and EDTA in the presence of nitrite and sodium chloride at 24°C. *International Journal of Food Microbiol.* 80: 251-259.
- **GIRARD G., (2010)**. Les propriétés des huiles essentielles dans les soins bucco-dentaire d’hier à aujourd’hui, thèse de doctorat en pharmacie, université de Nancy.
- **GIVRY S. (2006)**. Optimisation de procédés de fermentation lactique sur sirop de son de blé et purification et caractérisation d’une anaérobie isomérase de *Lactobacillus bifermentans*.

- **GORDON R. E., HAYNES W. C., PANG C.H.N. (1973).** The genus Bacillus. Agriculture Hand book. N° 427, ARS-USDA, Washington (USA).
- **GORINSTEIN S., DRZEVIECKI (2005).** Comparaison of the bioactive compounds and antioxidant potentials of fresh and cooked Polish ukrainian and israelien garlic. *Journal of Agriculture Food chemistry* 53(7):2726-2732
- **GOUGET C. (2013).** Additifs alimentaires, le guide indispensable pour ne plus vous empoisonner. Ed. Chariot d'Or, ISBN 978-2-9118-0669-8. 14e édition.
- **GRYSOLE J. (2004).** La commercialisation des huiles essentielles. Manuel pratique des huiles essentielles : de la plante à la commercialisation. 139-141.
- **GUESMI A. et BOUDABOUS A. (2006).** Activité antimicrobienne de cinq huiles essentielles associées dans les produits de thalassothérapie- les Plantes à Parfum, aromatiques et médicinales. Faculté des Sciences de Tunis, Université Tunis - El Manar, 2092, Tunis.
- **GUINOISEAU E. (2010).** Molécules antimicrobiennes issues des huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action. Thèse de doctorat de Corse.
- **GUTIERREZ J ;, BARRY-RYAN C., BOURKE P. (2008).** The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *Food Microbiol* 124(1): 91-7.
- **HADDOUCHI F., BENMANSOUR A. (2008).** Les huiles essentielles, utilisation et activités biologiques, application de deux plantes aromatiques. *Les technologies de laboratoire*. 8: 20-27.
- **HAMMAMI, R., A. ZOUHIR, J. BEN HAMIDA, I. FLISS. (2007).** « BACTIBASE: A Web-accessible Database for Bacteriocin Characterization », *BMC Microbiology*, vol. 7, n° 89, p. 7.
- **HAMMER K.A., CARSON C.F. (2011).** Antibacterial and Antifungal Activities of Essential Oils in Thormar H. Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents. Edition John Wiley & Sons, Ltd, United Kingdom. PP. 255-295.
- **HANOCK, R.E., and CHAPPLE, D.S (1999).** Peptide antibiotics. *Antimicrobial Agent Chemother.* 43, 6, 1317-23.
- **HAUWA M. (2012).** Environment Technology Division ,National Research Institute for Chemical Technology-Zaria,Nigeria. *International Journal of Science and Technology*, 2.
- **HELLAL Z. (2011).** Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des *Citrus* : Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). Mémoire de magistère, Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. 78 p.
- **HENG, N. C. K., WESSCOMBE, P. A., BRUNTON, J. P., JACKE, R.W., and TAGG, J. R. (2007).** The Diversity of Bacteriocins: Ecology and Evolution. Springer Verlag. Berlin Germany. Pp 45-92.
- **HOBZA P., MULDER F AND SANDORFY C. (1982).** *Journal of American Chemistry*, 104,925.

- **HORVATHG, JENEI JT, VAGVOLGYI C, BOSZORMENYI A, KRISCH J. (2016).** Effects of essential oil combinations on pathogenic yeasts and moulds. *Acta Biol Hung.*67(2):205-14. doi: 10.1556/018.67.
- **HURTEL J.M. (2001).** Phytothérapie, plantes médicinales, aromathérapie, huiles essentielles. <http://www.phytomania.com/index.html>.
- **ISMAIL H., LEMRISS S., BEN AOUN Z., MHADHEBI L., DELLAI A., KACEM Y., BOIRON P. and BOURAOUI A. (2008).** Antifungal activity of aqueous and methanolic extracts from the Mediterranean Sea cucumber. *Holothuria polii*. *18 (1)*, p: 23-26.
- **JACOBSEN E. G. (1993).** Catalytic asymmetric synthesis. *Ojima, Edition , VCH, New York, 1993, Chapter 4. 2.*
- **JEDIDI, H.( 2007).** Effet du stress gastro-intestinal sur la physiologie et le métabolisme des bactéries lactiques et probiotiques. Mémoire de Maître Es-Sciences, Institut de biologie, Université de Tlemcen. Université Laval Québec. 90 pages.
- **KABERA NZEYUMWAMI J., (2007).** Caractérisation des huiles essentielles de trois plantes aromatiques : *Hyptis spicigera*, *Pluchea ovalis* et *Laggetera aurita*. Université de Lomé-Togo.
- **KADRI N.(2009).** Evaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de l'ail cultivé (*Allium sativum*) de l'est Algérien vis-à-vis de différentes souches de *Pseudomonas aeruginosa*. Thèse de magister. Université Badji Mokhtar ,Algérie,76.
- **KEHAL F. (2013).** Utilisation de l'huile essentielle de *Citrus limon* comme agent conservateur et aromatique dans la crème fraîche. Thèse de magister de l'Université de Constantine 1'Algérie.
- **KETTLE S. F. A. (1999).** Physico-chimie inorganique, une approche basée sur la chimie de coordination, traduction française, De Boeck Université, Paris.
- **KHIDER A ., SIZINE K. (2013).** Etude in vitro de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Eucalyptus camaldulensis* et *Urtica dioica* en combinaison avec le vinaigre de pomme sur des bactéries responsables des infections nosocomiales. Thèse de magister de l'Université de Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou, Alger, 33, 37,49-65.
- **KLAENHAMMER TR. 1988.** Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS*.
- **KLAENHAMMERT.R. 2000.** Probiotic bacteria : Today and tomorrow. *Journal of Nutrition* 130: 4 15-4163.
- **KOKY L., GEORNARS I., PAIK HD., KIM KT., SOFOS JN. (2015).** Effects of plant-Derived Extracts, Other Antimicrobials, and Their Combinations against *Escherichia coli* O157: H7 in Beef Systems. *Food proteins*,78(6): 1090-7.
- **KUMARA R., SANGEETA O ., JOSHIB V K,VIKAS K ., SIYAMAK S . (2015).** Computational, crystal structure and antimicrobial studies of directly synthesized dichloroethylenediaminecopper (II) complex. *Commun. Inorganic Synth.* Vol. 3, N°1 (2015), 9-15.

- **LAHLOU M. (2004).** Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapie Research*.
- **LAREDJ H. (2004).** Les plantes médicinales: Extraction des huiles essentielles et activités antibactériennes. Premières journées de pharmacie. Université Badji Mokhtar -Faculté de Médecine, Annaba (Algérie). 17-29.
- **LASSUS S. M. (2014) .** Huile essentielle de giroflier. PASSEPORT SANTE.NET.
- **LEELARUNGRAYUB N, RATTANAPANONE V, et al (2006).** Quantitative evaluation of the antioxidant properties of garlic and shallot preparations. *Journal of Nutrition* ; 22(3):266-74.
- **LIS-BALCHIN M., BUCHBAUER G., HIRTENLEHNER T., RESCH M., (1998).** Antimicrobial activity of Pelagonium essential oils added to a quiche filling as a model food system. *Letters in Applied Microbiology*.
- **LONGARAY DELMARE A.P., IVETE T.M.P., LIANE A., LUCIANA A.S., et SERGIO E. 2007.**Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* and *Salvia triloba* cultivated in south brazil. *Food chemistry.*, 100 : 603-608.
- **LOSADA J., DEL PESO I. and BEYER L. (2001).** *Inorganica Chimica Acta.* , 2001, **321**, 107-115.
- **LUGASI A., HOVARI J., SAGIK., AND BIRO L. (2003).** The role of antioxidant phyto nutrients in the prevention of diseases.*Journal of Acta.biologica. szegediensis.* 47 (1-4):119-125.(Cited in Mohammedi Z, 2005)
- **LUSSIER-PRICE M. (2008).** Les bactériocines contre la résistance bactérienne. Laboratoire : Dr. James G. Omichinski.Université de Montréal.
- **MACHEIX J., FLEURIET A. et JAY-ALLEMAND C.( 2005).** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed Presses polytechnologiques et universitaires romandes. p4-5.
- **MADIGAN M., MARTINKO J.(2007).**Brock-Biologie des microorganismes.11ème édition.Pearson Education.France.1047p.
- **MAGNUSSON J. ET SCHNÜRER J. (2001).** *Lactobacillus coryniformis* subsp.Coryniformis strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1-5.
- **MAHMOUD B. S. M., YAMAZAKI K., MIYASHITA K., IL-SHIK S., DONG-SUK C., SUZUKI T. (2004).** Bacterial microflora of carp (*cyprius carpio*) and its shelf-life extension by essential oil compounds. *Food Microbiology.*21, 657-666.
- **MAKSIMOVIC M., DANIJELA V., MLADEN M., MARIJA E.S., SABAHEA A., et SONJAS.Y.(2007).** Effet of the environmental condition on essential oil profile in two dinaric *Salvia* species : *Salvia brachydon vandas* and *Salvia officinalis L.* *Biochemical Systematicsand Ecology.* 35 ,473-478.
- **MALECKY M. (2006).** Métabolisme des terpénoides chez les caprins, thèse de doctorat ,AgroParisTech.
- **MANN J. (1987).** Secondary metabolism, second edition, Clarendon press, Oxford, 374p.

- **MARIANNE P.(2008)**. Etude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore laurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques et hémi-synthèse. Université Du Québec à Chicoutimi ,27-30.
- **MC AULIFFE O., ROSS R.P et HILL C.( 2001)**. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbial. Reviews*.25: 285-308.
- **MEYER A., DEIANA J ET BERNARD A. (2004)**.Biosciences et techniques. Edition DOIN. France.304p.
- **MICHIEL S. J., MISSOTTEN, FREMAUT D., DE SMET S., DIERRICK N. (2007)**. In vitro dose-response of carvacrol, thymol, eugenol and trans-cinnamaldehyde and interaction of combinations for the antimicrobial activity against the pig gut flora. Department Biowetenschappen en Lands –chaps architecture. Hog school Gent, Voskenslaan 270, 9000 Ghent, Belgium.
- **MIEAN KH., MOHAMED S. (2001)**. Flavoinoid (myricetin quercetin kaempferol) content of edible tropical plant .*Journal of Agriculture Food chemistry* 49(6) : 3106-3112.
- **MILOS V., NIKOLIC A., MARINA Z., MIJAJLOVIC A., VERICA V., JEVTIC B., et al. (2014)**. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of copper(II) complexes with some S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid. Crystal structure of the binuclear copper(II) complex with S-methyl derivative of thiosalicylicacid. *Polyhedron* ,79 ,80–87.
- **MOHAMMEDI Z. (2006)**. Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Mémoire de Magistère, Département de biologie, Faculté des sciences, UABB de Tlemcen.
- **MOON H., RHEE MS. (2016)**. Synergism between carvacrol or thymol increases the antimicrobial efficacy of soy sauce with no sensory impact. *Microbioly Food*. 18,217,35-41.
- **MUSIOL S., MROZEK-WILCZKEIEWICZ A., POLANSKI J. (2014)**. Synergic against fungal pathogens: working together is better than working alone. *Curr Med Chem*. 21 ,870-93.
- **NAIT ACHOUR K. (2012)**. Etude de la composition chimique des essences de quatre espèces d'*Eucalyptus* poussant dans la région de Tizi-Ouzou. Thèse de magister de l'Université de Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou, Alger26, 27, 45, 46,53-54.
- **NACOULMA OG. (1996)**. Medicinal Plants and Their Traditional Uses in Burkina Faso. Ph.D.Thesis. University of Ouagadougou 328.
- **NILSEN T., NES I.F. and HOLO H. (2003)**. Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG2333. *Applied Environemental Microbioly*, **69**(5),2975-2984.
- **NOYCE J. O., MICHELS H., KEEVIL C.W. (2006)**. Use of Copper Cast Alloys To Control *Escherichia coli* O157 Cross-Contamination during Food Processing. University of Southampton, Biomedical Sciences Building, Bassett Crescent Eas.
- **ONIPPAM (1995)**. Bilan 1994 des huiles essentielles des plantes aromatiques : bilan en demi-teinte, Arome Ingrédients Additifs, 8, P. 23-26.

- **OPPEGARD C. (2007).** The two-peptide class II bacteriocins: structure, production and mode of action. *Journal of Microbioly Biotechnoly*, **13**(4), 210-219.
- **OUSSALAH M .,CAILLET S .,SAUCHIER L .,LACROIX M. (2006).** Inhibitory effects of selected plant essential oils on four pathogen bacteria growth: *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food control*,414-420.
- **OUSLIMANI S. et TAFER L. (2015).** Etude comparative de l'activité antimicrobienne de quelques composés d'origine végétale, animale et synthétique testés individuellement et en combinaison. Thèse de master, Université Mouloud Mammeri, Alger,58,59-60.
- **OUYEB L ., AIT HAMMI H .(2011) .** Etude comparative de l'effet antimicrobien de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* et de l'acide lactique (E270) sur quelques souches bactériennes et fongiques in vivo et in vitro. Thèse de master,Université Saad Dahleb, Alger, 70.
- **OWLA P. , SADERI H., RASOOLI I., SEFIDKONF . (2008).** Antimicrobial characteristics of some Helbal Oils on *Pseudomonas.aeruginosa* with special Reference to their chemical compositions. *Iranian Journal of Research*, **8**(2), 107-114.
- **OZCAN M. et CHALCHA J.C. (2004).** Aroma profile of thymus vulgaris L growing wild in Turkey. *Bulgaiian journal of plant psysiology.*, **30** (3-4): 68-73.
- **PAPAGIANNI M. (2007).** Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function and applications. *Biotechnoly Adv.*, **21**(6), 465-499.
- **PARIENTE L. (2001).** Dictionnaire des sciences pharmaceutiques et biologiques. 2<sup>ème</sup> Ed. Académie nationale de pharmacie. Paris 1643 p.
- **PAULI A. and SCHILER H. (2010).** In Vitro Antimicrobial Activities of Essential oils Monographed in the the European Pharmacoeia 6<sup>th</sup> Edition, In, In Baser K.H.C. et Buchbauer G. *Handbook of essential oils: science, Technology, and Applications*. Ed. Taylor and Francis Group, LLC. United states of America, p.353-548.
- **PERIAGO P.M., PALOP A. & FERNANDEZ P.S.(2001).** Combined effect of nisin, carvacrol and thymol on the viability of *Bacillus cereus* heat-treated vegetative cells. *Food Science Technology International*, Vol. 7 (6), pp. 487-492.
- **PIARD J.C. ET DESMAZEAND M. (2000).** Inhibiting factors produced by lactic and bacteria part L.oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait*. **71**: 525-541.
- **PIBIRI M.C. (2005).** Assainissement microbiologique de l' air et des systèmes de ventilation au moyen d' huiles essentielles. Thèse de doctorale. Ecole poly technique fédé rôle, EPFL. Lausanne (Suisse).
- **PIEROZA K. M. ET AL .,(2009).** Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils of *salvia* L. species; *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, **29**(4): 764-770, [out.-dez.universalis.fr/encyclopedie/complexes-chimie/3-principaux-domaines-d-application/](http://out.-dez.universalis.fr/encyclopedie/complexes-chimie/3-principaux-domaines-d-application/)

- **PIOCHON S.(2008)**. Etude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore laurentienne, composition chimique, activités pharmacologiques et hémi-synthèses, mémoire de maîtrise université du Québec à Chicoutimi.
- **PONCE A.G ., FRITZ R., DEL VALLE C., ROURA S.I . (2003)**. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss Chard 36, 679–684.
- **POOLE K. (2002)**. Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *Journal Application Microbioly* 92 Suppl, 55-64.
- **POPOVA T. P., ALEXANDROVA R. I., TUDOSE R., MOSOARCA E. M. and COSTISOR O. (2012)**. Antimicrobial activity in vitro of four nickel complexes. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 18 (No 3) 2012, 446-450.
- **POKORANI J., YANISHLEVA N. et GORDON H. (2001)**. Les antioxydants dans les aliments. Les applications pratiques. Woodhead Publishing Limited. CRC Press. Cambridge Angleterre.
- **RADULESCU V., SILVIA C., et EIIZA O. (2004)**. Capillary gas chromatography-mass spectrometry of volatile and semi volatile compound of *Salvia officinalis*. *Journal of Chromatography A.*, 1027 ,121-126.
- **RASOOLI I. (2007)**: food preservation – a bio-preservative approach, *food global science books* 1(2), p: 111.
- **RAYOUR L.(2003)**. Mechanism of bactericidal action of oregano and clove essential oils and of their phenolic major components in *Escherichia.coli* and *Bacillus subtilis*,*The journal of essential oil Research*.86,985-990.
- **REYES-JURADO F., LOPEZ-MALO A., PALOU E. (2016)**. Antimicrobial Activity of Individual and Combined Essential Oils against Food borne Pathogenic Bacteria. *Food Pro.* 79(2): 309-15.
- **RHAYOUR K. (2002)**. Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sue *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobactérium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*.Thèse de doctorat,Université Sidi Mohamed Ben Abdellah,158.
- **RIFFEL A, MEDINA L-F, STEFANI V, SANTOS R-C, BIZANI, BRANDELLE (2002)**. *In vitro* antibacterial Activity of a new series of 1, 4- naphtaquinones. *Brazillian journal of medical and biological research*. 35(7). 811-818
- **ROBARDS K, PRENZLER P.D, TUEKER G, SWATSITANG P, AND GLOVER W (1999)**. Antioxidant Properties of Phenolic Compounds . *Trends in Plant Science*. 2(4) : 152-159
- **SASS P., A. JANSEN C. SZEKAT V. SASS H.G. SAHL , and BIERBAUM G. (2008)**. « The Lantibiotic Mersacidin Is a Strong Inducer of the Cell Wall Stress Response of *Staphylococcus Aureus* », *BMC Microbioly*, vol. 8, p. 186.
- **SANTOYO S, CAVERO S., JAIME L., IBANEZ E., SENORANS FJ., REGLERO G .(2005)**. Chemical Merck Index, An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biological, 13th edition, United Metabolomics Standards Initiative (MSI).*Metabolomics* 3 (3):211-221.
- **SCOTT J. and BRADBURY R . (1994)**. Pharmacokinetic dosing of carbo platin; Fla J

Hosp Pharm, 14, 17-18.

- **SCHAUENBERG P, PARIS F. (2005).** Guide des plantes médicinales. Analyse, description et utilisation de 400 plantes. 2e ed. Ed Delachaux et Niestlé.
- **SEMEN E., HIZIROGLU S. (2005).** Production and Derivation of Volatile Oils, from Eastern Redcedar (*Juniperus Virginiana* L). *American Journal of Environmental sciences*; 1(2): 133-138.
- **SERRANO M. A ., MARTINEZ-ROMÉO D ., VALVERDE J.M ., ZAPATA P.J ., CASTILLO S ., VALERO D . (2008).** The addition of essential oils to MAPAs a tool to maintain the overall quality of fruits. *Trends in Food of Science and Technology*.464.
- **SHARMA R. P., SHARMA R., BALA R., VENUGOPALAM P. (2005).** *Journal of Chemistry Crystallogy*. **35**. 595.
- **SHIMOGAWA H., KURIBAYASHI S., TERUYA T., SUENAGA K., KIGOSHI H. (2006).** *Tetrahedron Lett*, **47**, 1409-1411.
- **SILVA N., FERNANDES JUNIOR A. (2010).** Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. *J. Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 402-413.
- **SLOWING K., GANADO P., SANZM RUIZ E. et TEJERINA T. (2001).** Study of garlic extracts and fractions on cholesterol plasma levels and vascular reactivity in cholesterolfed rats. *J Nut Mar*. 31,994-996.
- **SMULDERS F.J.M., BARENDSEN P., VAN LOGTESTIJN J.G., MOSSEL D.A.A. ET VAN DER MAREL G.M.1986.** Review: Lactic acid: considerations in favor of its acceptance as a meat decontaminant. *Journal of Food Technoly*,21: 419-436.
- **SOYCAN-ONEC S., KOC F., COSKUNTUNA L., OZDUVEN ML., GUMUS T. (2015).** The Effect of Oregano and Cinnamon Essential Oils on Fermentation Quality and Aerobic Stability of Field Pea Silages. *Asian-Australas J Anim Sci*. 28(9): 1281-7.
- **SUMNER L., AMBERG A., BARRETT D., BEGER R., DAYKIN C., FIEHN O., GOODACRE R., HARNLY J., HIGASHI R, KOPKA J., LANE A., MARRIOTT P., NICHOLLS A., THADEN J., VIANT M. (2007).** Proposed minimum States, merck & co. inc., 2350-2564, 2001.
- **TAGG, J.R. (2004).** Prevention of Streptococcal Pharyngitis by Anti-*Streptococcus pyogenes* Bacteriocin-like Inhibitory Substances (BLIS) Produced by *Streptococcus salivarius* », *Indian J Med Res*, vol. 119, p. 13-16.
- **TAPIERO H., TEW K.D., NGUYEN B.G., and MATHE G. (2002).** Polyphenol do they play a role in the prevention, of the human pathologies? *Biomed.pharmacothey*. 56: 200-207.
- **TEUSCHER E., ANTON R. et LOBSTEIN A. (2005)** – plantes aromatiques: épices, aromates, condiments et huiles essentielles. Tec et Doc éditions, Paris.
- **THARANATHAN R.N. (2003).** Biodegradable films and composite coatings: Past, present and future. *Trends in Food Science and Technology*. (14) 71-78.
- **Tortora G.J., Funke B.R. et Case C.L. (2003).** Introduction à la microbiologie. Edition du nouveau pédagogique Canada.945p.

- **TREINER J. (2000).** Extrait du Bulletin officiel n° 6 du 12 août 1999, France. 39-143.
- **Tripti M., Padma S., Shailja P., Nirpendra C., Hema L. (2011).** Potentiation of Antimicrobial Activity of Ciprofloxacin by Pelargonium graveolens Essential Oil against Selected Uropathogens. *Phytother. Res.* 25. Issue 8 pages 1225–1228.
- **TURGEON M. (2001).** Profil des produits forestiers-Première transformation-Huiles essentielles. Ministère des ressources naturelles. Ww.mrn.gouv.
- **VIGNOLO F., TOURDOT-MARECHAL R. ET YVON M., 2008.** Métabolisme et ingénierie métabolique. *In* : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). *Tec & Doc, Lavoisier*. Paris. 271-447.
- **WANG B.S., Li B.S. and ZENG Q.X. (2008).** Antioxidant and free radical scavenging activities of pigments extracted from molasses alcohol wastewater. *Food chemistry.* 107,1198-1204.
- **XIANGHONG W., ZHENMING C., LIXI Y., JING L., MEIJU L ET LONGFEI W. (2007).** A marine killer yeast against the pathogenic yeast strain in crab (*Portunus trituberculatus*) and an optimization of the toxin production *Microbiological Research* .77-85.
- **YOU WC., Li JY., et al., (2005).** Etiology and prevention of gastric cancer: a population study in a high risk area of China. *Chin J Dig Dis* ; 6(4):149-154.
- **YONGYU Z ., SHUJUN S ., JIANE D ., WENYU W ., HUIJUAN C ., JIANBING W ., XIAOJUN G. (2011).** Quality Control Method of Herbal Medicine-Chemical Fingerprint Analysis. *In* : Soyama Y (ed) Quality Control of Herbal Medicines and Related Areas. *International Technology* , pp171-194.
- **ZHIRI A. (2006).** Les huiles essentielles chemotypées et leur synergie.
- **ZIEGLER J., FACCHINI PJ. (2008).** Alkaloid Biosynthesis . *Metabolism and Trafficking.* *Annu Rev Plant Biol.* 2008 ; 59 : 735 – 769.

# *Annexes*

**Annexe 1** Composition des milieux de culture utilisés (g /l).

Le milieu TSA est utilisé pour la conservation des souches bactériennes purifiées.

La Gélose Mueller Hinton (MH) est utilisée pour la pré-culture des souches bactériennes, la mise en évidence de l'activité antibactérienne des différents agents antimicrobiens testés, la détermination de la CMI et la CMB ainsi que pour la réalisation des différentes combinaisons.

L'eau physiologique est utilisée pour réaliser les suspensions microbiennes.

- Gélose trypto caséine soja agar
  - Hydrolysate enzymatique de caséine..... 15g
  - Peptone de soja ..... 5g
  - Chlorure de sodium.....7g
  - Agar ..... 15g
  - Eau distillée ..... 1000ml
  - Stérilisation à 120°C pendant 15 mn.
  
- Gélose Mueller Hinton
  - Extrait de viande ..... 3g
  - Hydrolysate acide de caséine..... 17,5g
  - Agar ..... 18g
  - Eau distillée..... 1000ml
  - pH=7,4
  - Stérilisation à 120°C pendant 15 mn.
  
- Eau physiologique stérile
  - Chlorure de sodium (NaCl)..... 9g
  - Eau distillée..... 1000ml
  - pH=7
  - Stérilisation : autoclavage à 120°C pendant 20 mn.

## **Annexe 2** La coloration de Gram.

La coloration de Gram, réalisée selon la méthode décrite par DELARRAS (2007) :

- \* Préparer un frottis de la souche test ;
- \* Coloration primaire : Couvrir la lame de violet de gentiane, et laisser agir pendant 1 minute. Les cellules bactériennes se colorent en violet ;
- \* Mordançage : Plonger la lame dans une solution de lugol pendant 1 minute pour fixer le colorant ;
- \* Décoloration : Effectuer une décoloration à l'alcool éthylique, laisser agir 30 secondes. Le but de cette opération est de décolorer les bactéries à GRAM- dont la paroi est riche en lipides qui se dissolvent dans l'alcool (solvant organique)
- \* Rincer à l'eau distillée afin de ne pas décolorer les GRAM+
- \* Coloration secondaire : Effectuer une contre-coloration à la fuchsine pendant 1 minute. Les GRAM- qui ont été décolorées sous l'effet de l'alcool se recolorent en rose. Ainsi, il sera possible de différencier les deux groupes bactériens ;
- \* Rincer la lame à l'eau distillée stérile ;
- \* Egoutter et sécher au dessus du bec bunsen
- \* Observer à l'objectif x100 à l'immersion.

La résistance bactérienne aux agents antimicrobiens apparait de nos jours comme une des préoccupations majeures de santé publique. La recherche de nouvelles substances antimicrobiennes naturelles comme alternative revêt donc un intérêt tout particulier.

Cette étude a pour objectif principal d'évaluer *in vitro* et de comparer l'activité antibactérienne de quelques composés d'origine végétale, en l'occurrence l'huile essentielle de thym (HET), de l'ail, de clou de girofle, d'eucalyptus et de la sauge, versus un métabolite d'origine microbienne, l'acide lactique. Afin de déterminer d'éventuelles interactions positives renforçant le pouvoir antibactérien des substances testées, nous avons procédé à des combinaisons à deux entre les huiles essentielles et l'acide lactique ainsi qu'avec un complexe chimique à base d'uracile.

Selon les résultats obtenus, les six souches bactériennes testées s'avèrent plus sensibles à l'HET ainsi qu'à l'acide lactique. La plus faible CMI enregistrée est de 0.16% obtenue avec l'HET inhibant *E. coli* et *B.cereus* et avec l'HE clou de girofle active sur *B.cereus* et l'acide lactique sur

*P. aeruginosa*.

Il ressort des résultats des combinaisons un même effet inhibiteur à des concentrations sub-inhibitrices réduites des agents combinés, ceci indique alors une interaction positive entre les agents testés. En effet, un effet inhibiteur synergique a été observé lors de l'association de l'HET avec l'acide lactique, ce résultat intéressant indique la possibilité d'inhiber la croissance microbienne par réduction de 90% la concentration de l'acide lactique et de 80 % celle de l'HET.

De même la combinaison de l'HET avec un complexe chimique a permis de réduire leurs concentrations respectivement de 88% et 86%.

**Mots clés :** agents antimicrobiens, huiles essentielles, acide lactique, combinaisons, complexe chimique.

Bacterial resistance to antimicrobial agents is today one major public health concerns. The search for new natural antimicrobial substances such alternative is therefore of particular interest.

The main objective of this study is to evaluate and compare in vitro antibacterial activity of some compounds of plant origin, namely the essential oil of thyme (HET), garlic, cloves, eucalyptus and sage, versus a microbial metabolite, lactic acid. To determine possible positive interactions strengthening the antibacterial substances tested, we conducted two combinations between essential oils and lactic acid as well as uracil based chemical complex.

According to the results obtained, the six bacterial strains tested are more sensitive to essential oils as well as lactic acid. The lowest CMI recorded is 0.16% obtained with the thyme essential oils inhibiting *E. coli* and *B.cereus* and with active clove essential oils tested on *B. cereus* and lactic acid on *P. aeruginosa*.

Combinations resulted in same effect at sub-inhibitory concentrations reduced by the combined agents, indicating a positive interaction between the agents tested. In fact, a synergistic inhibitory effect was observed with combination of thyme essential oils and lactic acid, this interesting result indicates the possibility of microbial growth inhibition reducing the concentration of lactic acid (90%) and thyme essential oils (80%).

Similarly the combination of thyme essential oils with a chemical complex has reduced their concentrations of 88% and 86% respectively.

**Keywords:** antimicrobial agents, essential oils, lactic acid, combination, pathogens, chemical complex.