

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Mouloud MAMMARI de TIZI-OUZOU

Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques  
Département de Biochimie et de Microbiologie



## MEMOIRE DE FIN D'ETUDES



En vue de l'obtention du  
Diplôme du Master académique en Biologie  
Option : Microbiologie Appliquée

# Thème

*Etude comparative de l'activité antimicrobienne  
de quelques composés d'origine végétale, animale  
et synthétique testés individuellement et en  
combinaison.*

Proposé et dirigé par : *D' AMROUCHE T.*

Réalisé par :

*M<sup>lle</sup> : OUSLIMANI Saïda*

*M<sup>lle</sup> : TAFER Lynda*

Soutenu publiquement le: 17 / 09 / 2015, devant le jury :

Président :	Mr SADOUDI Rabah	M.C. UMMTO
Promoteur :	M <sup>r</sup> AMROUCHE T.	M.C. UMMTO
Examinatrice :	Melle LAMMI Sarah	Maitre assistante chargée de cours
Examineur :	Mme HELLAL Zohra	Maitre assistante chargée de cours

*Promotion : 2014 - 2015*

## *Remerciements*

---

*Dieu le tout puissant, maitre des cieux et des terres, merci de nous avoir donné le courage, la force et la patience pour finir ce modeste travail.*

*Ce sujet a été proposé par Mr AMROUCHE T. maitre de conférences à l'UMMTO, nous lui exprimons nos plus vifs remerciements pour avoir accepté de nous encadrer ainsi que nos profondes gratitudees pour avoir orienté et dirigé ce travail malgré ses multiples occupations.*

*Nos sincères gratitudees aux membres du jury d'avoir accepté d'examiner et d'évaluer ce travail.*

*De précieux remerciements vont au Pr ADKHIS et son équipe notamment Mme BARIJDI de nous avoir reçus dans leur laboratoire et de nous avoir fourni un des agents antimicrobiens testé dans cette étude.*

*Nous présentons nos sincères remerciements à Dr KADOUCHE Slimane du département de chimie de nous avoir fourni les échantillons du chitosane.*

*Nous remercions aussi l'équipe du laboratoire de mycologie du CHU NEDDIR Mohammed de nous avoir procuré la souche de levure. Ainsi que le département des sciences biologiques et agronomiques de l'université de Laghouat de nous avoir aimablement fourni la moisissure.*

*Nos sincères remerciements au personnel du laboratoire de microbiologie de la société pharmaceutique (Aldaph-Novonordisk) de nous avoir fourni les souches bactériennes.*

*Nous remercions également les techniciennes du laboratoire de microbiologie du département d'Agronomie et du laboratoire commun de microbiologie du département biologie de l'UMMTO pour leur aide précieuse.*

*Et enfin, nous exprimons nos sincères remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.*

## *Dédicace*

*En guise de reconnaissance envers mon DIEU le Tout Puissant*

*Je dédie ce modeste travail à :*

*Mes très chers parents, qui m'ont donné la vie, qui m'ont éduqué et qui m'ont beaucoup soutenu tout au long de mes études, mon cher papa pour tout les conseils et les sacrifices qu'il a prodigué pour sa fille et ma très chère maman, qui, quoi que je puisse faire pour elle, je ne saurai guère lui rendre tout l'amour, toute tendresse, la patience et le meilleur d'elle-même qu'elle me donnait.*

*A mes frères adorables, Mohamed et chabane*

*A ma tante adorable, Ferroudja*

*A mes oncles, Farid et Nacer et leurs femmes, Dehbia et Hassina*

*A mes cousines, Messad, Laetitia*

*A mes cousins, Fatah, Silace et le plus petit de la famille Yauram*

*A tout mes Amis (es)*

*A tous les miens*

*A ceux qui m'ont tout donné sans retour*

*Lydia*

# Dédicaces

*En guise de reconnaissance, je dédie ce travail à :*

- *La mémoire de mon très cher père que son âme repose en paix.*
- *Ma mère, qu'elle accepte ce travail en guise de remerciement de tous les sacrifices qu'elle a consentis pour mon éducation, je ne saurais à travers cette dédicace lui exprimer le dévouement et le respect que je porte pour elle.*
- *Mon frère Abdelouahab.*
- *La mémoire de mes grands parents paternels et mon grand père maternel.*
- *Ma grand-mère maternelle*
  - *Mes oncles et tantes.*
  - *Mes cousins et cousines.*
  - *Mes amis*
- *Tous ceux qui me sont chers, vivants ou morts.*

*Saida.*

# Liste Des Tableaux

---

<b>Tableau I:</b> Principales classes de composés phénoliques.....	5
<b>Tableau II:</b> Activités biologiques des composés phénoliques.....	6
<b>Tableau III:</b> Les principaux constituants des huiles essentielles (HE) à activité antibactérienne.....	7
<b>Tableau IV:</b> Propriétés physico-chimiques du Cuivre.....	13
<b>Tableau V :</b> Spectre d'activité des principales familles de désinfectants et d'antiseptiques...	14
<b>Tableau VI :</b> Avantages et inconvénients notables des certains agents antimicrobiens.....	15
<b>Tableau VII :</b> Les complexes chimiques testés et leurs ligands.....	32
<b>Tableau VIII:</b> Profil chromatographique de l'huile essentielle de <i>thymus vulgaris</i> (seuls les composés de pourcentage supérieur à 0,05 % ont été rapportés).....	33
<b>Tableau IX:</b> CMI des souches bactériennes et fongiques exprimées en pourcentage.....	53
<b>Tableau X :</b> Valeurs (%) des CMB et des CMF.....	54
<b>Tableau XI :</b> Résultats de la combinaison des complexes chimiques avec l'H.E.T.....	54
<b>Tableau XII :</b> Résultats de la combinaison des complexes chimiques avec l'acide citrique.....	56
<b>Tableau XIII :</b> Résultats de la combinaison de l'H.E.T avec l'acide citrique testé sur <i>E.coli</i> .....	57
<b>Tableau XIV :</b> Résultats de la combinaison de l'H.E.T avec l'acide citrique testé sur <i>B. cereus</i> .....	58
<b>Tableau XV :</b> Résultats de la combinaison de l'H.E.T avec l'acide testé sur <i>C. albicans</i> ....	58

## Liste Des Figures

---

<b>Figure 1:</b> Structure chimique du chitosane.....	9
<b>Figure 2:</b> Production de la chitine et du chitosane.....	10
<b>Figure 3:</b> Schéma montrant un modèle de complexe chimique à base de cuivre.....	12
<b>Figure 4 :</b> Mécanismes d'action des agents majeurs chimio-thérapeutiques antibactériens...	16
<b>Figure 5 :</b> Mode d'action des bactériocines de bactéries lactiques.....	19
<b>Figure 6 :</b> Action des huiles essentielles et de leurs constituants sur la cellule bactérienne...	19
<b>Figure 7 :</b> Mode d'action antimicrobienne des acides organiques.....	21
<b>Figure 8:</b> Résultats de la coloration de Gram.....	42
<b>Figure 9:</b> Effet du DMSO sur les bactéries étudiées .....	43
<b>Figure 10:</b> Effet des antibiotiques de référence sur les bactéries étudiées.....	44
<b>Figure 11:</b> Criblage des complexes chimiques sur la base de leur pouvoir antibactérien .....	44
<b>Figure 12:</b> Effet inhibiteur des complexes chimiques sur la croissance des bactéries testées .....	45
<b>Figure 13:</b> Effet inhibiteur de l'HET, de l'acide citrique et du chitosane sur la croissance d' <i>E. coli</i> et de <i>B. cereus</i> .....	46
<b>Figure 14:</b> Effet de l'HET sur les souches bactériennes.....	46
<b>Figure 15:</b> Photos illustrant l'aspect macroscopique (colonies) des souches fongique.....	49
<b>Figure 16:</b> Photo montrant l'aspect microscopique des souches fongiques testées.....	49
<b>Figure 17:</b> Effet du témoin négatif (DMSO) sur les souches fongiques.....	50
<b>Figure 18:</b> Les résultats du criblage des complexes chimiques sur les souches fongiques...	50
<b>Figure 19:</b> Effet antifongique de l'HET, de l'acide citrique et du chitosane sur les souches fongiques.....	51
<b>Figure 20:</b> Photo illustrant l'effet de l'HET sur <i>Asp. niger</i> après 72h d'incubation.....	52
<b>Figure 21:</b> Effet du chitosane sur la croissance d' <i>Asp. niger</i> .....	53
<b>Figure 22:</b> Photos comparant l'effet des complexes employés seuls et combinés avec l'HET.....	56

**CCLIN** : Centre de Coordination de la Lutte contre les Infections Nosocomiales.

**CMB** : Concentration Minimale Bactéricide.

**CMF** : Concentration Minimale Fongicide.

**CMI**: Concentration Minimale Inhibitrice.

**CMR**: Chemical Marketing Reporter

**DMSO**: Di-Méthyl-Sulfoxyde.

**EFSA**: European Food Safety Authority.

**FDA**: Food and Drug Administration

**FFC**: Food Chemical Codex

**FML** : Fermentation en Milieu Liquide

**FMS** : Fermentation en Milieu Solide

**HPLC**: High-Performance Liquid Chromatography.

**MH** : Mueller Hinton.

**mM** : milli Molaire.

**PET** : Polyéthylène Téréphtalate

**Ph E**: Pharmacopée Européenne

**pH** : potentiel d'Hydrogène.

**pKa** : constante d'acidité.

**PLP**: Protéine de Liaison aux Pénicillines.

**RMN** : Résonance Magnétique Nucléaire.

**UFC** : Unité Formant Colonie.

**UV-Visible (spectrométrie)** : Spectrométrie Ultraviolette-Visible.

## Résumé

La lutte contre les microorganismes pathogènes et ceux causant l'altération des denrées alimentaires suscite un intérêt grandissant aussi bien en industrie alimentaire qu'en milieu hospitalier. L'intérêt est tout particulier lorsqu'il s'agit de l'éradication de la résistance bactérienne aux antibiotiques de référence, d'où alors la nécessité de rechercher de nouvelles molécules à pouvoir antimicrobien. Cette étude a pour objectif principal d'évaluer et comparer l'activité antibactérienne et antifongique de quelques composés d'origine végétale: huile essentielle de thym (HET), animale: le chitosane et chimique: l'acide citrique et les complexes métalliques à base de cuivre. Les tests effectués sur des souches bactériennes et fongiques pathogènes ont montré que la plupart des substances testées se sont avérées inhibitrices de la croissance microbienne. En effet, *E. coli*, *B. cereus* ainsi que *C. albicans* se sont montrés sensibles aux agents testés. Toutefois, *Asp. niger* était extrêmement sensible à l'HET mais résistants aux autres substances testées. Après la détermination des CMI, CMB et CMF, des combinaisons entre les substances ont été réalisées afin de déterminer d'éventuelles interactions positives renforçant le pouvoir antibactérien et/ou antifongique des substances testées. Les résultats ainsi obtenus ont permis l'obtention d'un même effet à des concentrations sub-inhibitrices réduites des agents combinés, ceci indique alors une interaction positive entre les agents testés. En effet, un effet inhibiteur additionnel a été observé lors de l'association de l'HET avec l'acide citrique, ce résultat intéressant indique la possibilité d'inhiber la croissance microbienne par réduction de 50 % la concentration de l'acide citrique et de 25 % celle de l'HET.

**Mots clés :** agents antimicrobiens naturel, agents antimicrobiens synthétique, activité antibactérienne, activité antifongique, CMI, combinaisons, Huile essentielle de thym, chitosane, acide citrique, complexes chimiques.

## Abstract

The fight against pathogenic microorganisms and those causing food spoilage is of growing interest both in food industry in a hospital environment. The interest is special regarding to the eradication of bacterial resistance to referenced antibiotics, which then need investigation of new molecules with antimicrobial potential. The main objective of this study is to evaluate and compare the antibacterial and antifungal activity of some compounds from plant: thyme essential oil (TEO), animal: chitosan and chemical: citric acid and copper-based complexes. Tests conducted on pathogenic bacterial and fungal strains shown that most of the substances tested were found to inhibit microbial growth. Indeed, *E. coli*, *B. cereus* and *C. albicans* were shown sensitive to the tested agents. However, *Asp. Niger* was extremely sensitive to the TEO but resistant to the other substances tested. After MIC, MBC and MFC, combinations between substances were conducted to determine possible positive interactions strengthening the antibacterial and / or antifungal effect of tested substances. The obtained results demonstrated the same effect at low sub-inhibitory concentrations of combined agents, indicating a positive interaction between agents tested. Indeed, additional inhibitory effect was observed with the combination of citric acid and TEO, this interesting result indicates the possibility of inhibiting microbial growth by 50% reduction of citric acid concentration and 25% reduction of TEO concentration.

**Keywords:** antimicrobials, antibacterial activity, antifungal activity, MIC, combinations, thyme essential oils, chitosan, citric acid, chemical complexes.

Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Résumé	
Abstract	
Sommaire	
Introduction générale.....	1

## Première partie : Synthèse bibliographique

### Chapitre I : Les agents antimicrobiens

I.1. Définition.....	2
I.2. Les agents antimicrobiens naturels.....	2
I.2.1. Les agents antimicrobiens naturels d'origine microbienne.....	2
I.2.2. Les agents antimicrobiens naturels d'origine végétale.....	4
I.2.3. Les agents antimicrobiens naturels d'origine animale.....	9
I.2.4. Les acides organiques.....	11
I.3. Les agents antimicrobiens synthétiques.....	11
I.3.1. Les antibiotiques synthétiques et semi synthétiques.....	11
I.3.2. Les complexes chimiques.....	12
I.3.3. Les désinfectants et les antiseptiques.....	14
I.4. Avantages et inconvénients de certains agents antimicrobiens.....	15

### Chapitre II : Mécanismes d'action des agents antimicrobiens

I. Mécanismes d'action des antibiotiques .....	16
II. Mécanismes d'action des bactériocines .....	17
III. Mécanismes d'action des huiles essentielles .....	19

IV.	Mécanismes d'action du chitosane .....	20
V.	Mécanismes d'action des acides organiques.....	21
VI.	Mécanismes d'action des complexes chimiques.....	22
VII.	Action combinée des agents antimicrobiens.....	23
VIII.	Comparaison huile essentielle / antibiotiques.....	24

## **Chapitre III : Applications industrielles des agents antimicrobiens**

I.	Applications des bactériocines.....	25
II.	Applications des huiles essentielles.....	26
III.	Applications du chitosane.....	28
IV.	Applications de l'acide citrique.....	29
V.	Application des complexes chimiques.....	30

## **Deuxième partie : Etude expérimentale**

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

I.	Matériel biologique.....	31
II.	Etude préliminaire (screening).....	36
III.	Détermination des CMI.....	39
IV.	Détermination des CMB et CMF.....	40
V.	Combinaisons des agents antimicrobiens.....	40

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

I.	Criblage des substances antimicrobiennes (screening).....	42
II.	Concentrations minimales inhibitrices (CMI).....	53
III.	Concentrations minimales bactéricides (CMB) et fongicides (CMF).....	54
IV.	Effets des combinaisons des substances étudiées.....	55

Conclusion et perspectives .....	61
----------------------------------	----

Références bibliographiques.

Annexes.

Les microorganismes nuisibles, en particulier les bactéries et les mycètes, sont redoutés pour leurs effets négatifs sur la qualité d'un aliment, car ils affectent la salubrité et l'innocuité de ce dernier. En effet, un aliment exposé à la détérioration par les bactéries et les moisissures perd ses caractéristiques sensorielles, nutritives et sanitaires (Rozier *et al.*, 1986; Guiraut, 2003). Afin de réduire cet impact négatif des microorganismes, différentes techniques de conservation sont utilisées (traitements thermiques, froid, agents conservateurs, etc.). Dans l'industrie alimentaire, la stabilisation des produits alimentaires nécessite le recours aux conservateurs alimentaires.

Cependant, la nature des agents conservateurs utilisés reste une des questions les plus importantes pour la santé publique (Burt, 2004).

De plus, la résistance bactérienne aux agents antimicrobiens apparaît de nos jours comme une des préoccupations majeures de santé publique. Ceci résulte de l'émergence et la dissémination de souches bactériennes résistantes résultant de l'usage anarchique et abusif des antibiotiques conventionnels, combiné aux nombreuses mutations génétiques qui surviennent dans le monde bactérien (Perretein *et al.*, 1997).

Afin de remédier à cette situation inquiétante, il devient impératif et urgent de développer de nouvelles classes d'agents antimicrobiens. À cet égard, l'utilisation de ces agents, d'origine végétale, animale et chimique pour lutter contre ces microorganismes pathogènes revêt un intérêt particulier (Kaufmann, 1997).

A ce titre, les huiles essentielles, comme agents antimicrobiens d'origine végétale, représentent un outil très intéressant pour augmenter la durée de conservation des produits alimentaire étant donné leur richesse en molécules bioactives. Ces substances naturelles riches en composés antimicrobiens et antioxydants sont considérés comme une alternative importante pour résoudre le problème de résistance (Sarrano, 2008).

Récemment, les recherches se sont focalisées sur les produits chitineux et leurs dérivés, en particulier le chitosane qui se révèle le plus attractif économiquement. Ses propriétés intrinsèques, son abondance, sa biodégradabilité constituent des atouts majeurs pour son utilisation pour une dépollution respectueuse de l'environnement et aussi dans l'alimentation et la cosmétologie (Wen *et al.*, 2005 ; Lima *et al.*, 2006).

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).

Notre travail a pour objectif d'évaluer et comparer *in vitro* l'activité antibactérienne et antifongique de quelques substances d'origine végétale, animale et chimique, respectivement l'huile essentielle de *Thymus vulgaris*, le chitosane (extrait de la carapace des crevettes roses), l'acide citrique et complexes chimiques (à base de cuivre). L'interaction entre les substances est également étudiée 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 agents antimicrobiens*

## **I. Les agents antimicrobiens**

### **I.1. Définition**

Sous le terme « agent antimicrobien » sont regroupés différentes molécules d'origine naturelle (microbienne, végétale ou animale), semi-synthétique ou synthétique qui ont la capacité d'éliminer ou de réduire la prolifération de microbes. Les microbes visés par un antimicrobien peuvent être des bactéries, des virus, des mycètes ou des parasites. Les traitements antibiotiques font également partie des antimicrobiens.

Les antimicrobiens peuvent être utilisés sur l'homme, les produits alimentaires, ou pour assainir un environnement (Hordé, 2014).

### **I.2. Les agents antimicrobiens naturels**

#### **I.2.1. Les agents antimicrobiens naturels d'origine microbienne**

Selon Cotter *et al.* (2005), lorsque deux souches distinctes de bactéries se retrouvent dans un même environnement, elles doivent se battre pour les ressources accessibles. Pour ce faire, chaque souche bactérienne est capable de sécréter différentes molécules qui sont très efficaces pour combattre différentes souches de bactéries entrant en compétition avec elle. Parmi ces molécules, les plus étudiés sont les antibiotiques et les bactériocines.

##### **I.2.1.1. Les antibiotiques naturels**

Les antibiotiques naturels essentiellement produits par les bactéries (Streptomycine produite par *Streptomyces*) et les champignons (Pénicilline produite par *Penicillium*) se caractérisent par leur synthèse uniquement enzymatique. Après la découverte du premier antibiotique, la Pénicilline, par Alexandre Fleming en 1929, l'homme a largement développé et utilisé ces molécules pour se prémunir des infections bactériennes (Hancock et Chapple, 1999), mais, l'utilisation intensive de ces molécules a conduit, dès les années 1940, à l'apparition de souches résistantes (Gill, 2008).

Aujourd'hui, on connaît des souches résistantes à toutes les classes d'antibiotiques connues. Ce danger potentiel a amené les scientifiques à revoir la façon d'utiliser les antibiotiques et à chercher d'autres agents antimicrobiens dont la structure et le mode d'action, différents de ceux des antibiotiques, permettraient de pallier ces phénomènes de résistance (Morisset, 2002).

##### **I.2.1.2. Les bactériocines**

Les bactériocines sont définies comme des molécules sécrétées par les bactéries, de nature protéique ou partiellement protéique, le plus souvent cationiques, modifiées ou non post-traductionnellement, de masse moléculaire comprise entre 2 et 6 kDa (Heng *et al.*, 2007),

et douées d'une activité antagoniste vis-à-vis de souches phylogénétiquement proches des souches productrices, ce qui permet à ces molécules d'être très spécifiques envers les espèces bactériennes apparentées. Par exemple, la colicine V, bactériocine produite par *Escherichia coli* V, inhibe la croissance d'une autre souche d'*E. coli*.

Ainsi, contrairement aux antibiotiques, elles peuvent cibler spécifiquement les bactéries pathogènes sans tuer celles essentielles pour notre système (Reddy *et al.*, 2004). Aussi, leur synthèse par voie ribosomique les différencie des antibiotiques de nature peptidique provenant de l'assemblage enzymatique d'acides aminés libres (Cenatiempo *et al.*, 1996).

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-traductionnellement (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. 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 bactérienne.

Certains critères des bactériocines justifient leur choix comme bio-conservateurs (Gálvez *et al.*, 2007 ; Thakur et Roy, 2009) :

- Considérées comme 'GRAS' (Generally Recognized As Safe) ;
- Inactives et non toxiques contre les cellules eucaryotes ;
- Généralement thermostables et tolérantes aux variations du pH ;
- Possèdent un spectre d'activité relativement large ;
- Mode d'action généralement bactéricide (membrane cytoplasmique) ;
- Sensibilité aux protéases et digestibilité dans le tractus intestinal.

**I.2.2. Les agents antimicrobiens naturels d'origine végétale**

Depuis la nuit des temps, les hommes apprécient les vertus apaisantes et analgésiques des plantes. Aujourd'hui encore, les deux tiers de la pharmacopée ont recours à leurs propriétés curatives. A travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales.

Les molécules bioactives produites par les végétaux correspondent aux métabolites secondaires, ces derniers n'exercent pas de fonctions directes au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal, comme la croissance, ou la reproduction (Garcia-Salas *et al.*, 2010). Les métabolites secondaires interviennent dans l'adaptation de la plante à son environnement ainsi que la régulation des symbioses et d'autres interactions plantes-animaux, la défense contre les prédateurs et les pathogènes, comme agents allélopathiques ou pour attirer les agents chargés de la pollinisation ou de la dissémination des fruits (JUDD *et al.*, 2002).

**I.2.2.1. 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). A l'heure actuelle, plus de 8000 molécules ont été isolées et identifiées (Mompon *et al.*, 1998).

Les principales classes de polyphénols sont résumées dans le Tableau I.

**Tableau I:** Principales classes de composés phénoliques (HENNEBELLE, 2006)

Nombre d'atome de carbone	Squelette de base	Classe	Exemple	Plantes
6	C6	Phénols simples	Catéchol, hydroquinone	Busserole
7	C6-C1	Acides phénols benzoïques	Acide gallique, acide salysalique, vanilline	Artichaut Saule
8	C6-C2	Acétophénonnes 3-acétyl6-	Méthoxybenzaldehyde	Saule
9	C6-C3	Acides phénols Cinnamiques	Acide coumarique, acide caféique	Romarin Marronnier d'Inde
10	C6-C4	Naphtoquinones	Shikonine	Drosera spp
13	C6-C1-C6	Xanthonnes	Bellidifoline, mangoctine	Racine de gentiane Centaurée
14	C6-C2-C6	Stiblènes	Hydrangénol, pinosylvine	Raisin Pin
15	C6-C3-C6	Flavonoïdes Isoflavonoïdes	Quercétine, Roténoïde	Ginkgo Thym Camomille
18	(C6-C3) <sub>2</sub>	Lignanes	Matairésinol	Chardon
30	(C6-C3-C6) <sub>2</sub>	Bi flavonoïdes	Amentoflavone Hinokiflavone	Carcina Hypercum
N	(C6-C3-C6) <sub>n</sub>	Tanins condensés (proanthocyanidols)	Aesculitanins	Marronnier d'Inde, Vigne

Les activités biologiques des principaux composés phénoliques sont présentées dans le Tableau II.

**Tableau II:** Activités biologiques des composés phénoliques (BAHORUN, 1997)

Polyphénols	Activités	Références
Acides phénols (cinnamiques et benzoïques)	Antibactériens	DIDRY <i>et al.</i> , 1982
	Antifongiques	RAVN <i>et al.</i> , 1984
	Antioxydants	HAYASE et KATO, 1984
Coumarines	Vasoprotectrices et antioedémateuse	MABRY et MATULA, 1992
Flavonoïdes	Anti-tumorales	STAVRIC et MATULA, 1992
	Anti-carcinogènes	DAS <i>et al.</i> , 1994
	Anti-inflammatoires	BIDET <i>et al.</i> , 1987
	Hypotenseurs et diurétiques	BRUNETON, 1993
Anthocyanes	Antioxydants	ARUOMA <i>et al.</i> , 1995
	Protection des veines et capillaires	BRUNETON, 1993
Pro-anthocyanidines	Effet stabilisant sur le collagène	MASQUELIER <i>et al.</i> , 1979
	Antioxydants	BAHURON <i>et al.</i> , 1996
	Anti-tumorales	DE OLIVERA <i>et al.</i> , 1972
	Antifongiques	BROWNLEE <i>et al.</i> , 1992
	Anti-inflammatoires	KREOFISKY <i>et al.</i> , 1992
Tannins galliques et catéchiqes	Antioxydants	OKUDA <i>et al.</i> , 1983 OKUMURA <i>et al.</i> , 1993

### I.2.2.2. Les huiles essentielles

Les huiles essentielles (HE) appelées aussi essences, sont des mélanges naturels complexes de métabolites secondaires, isolées des plantes par hydro-distillation ou par expression mécanique (Kalemba et Kunicka, 2003). Elles se trouvent sous forme de minuscules gouttelettes dans les feuilles, la peau des fruits, la résine, les branches et les bois, les bourgeons, les fleurs, les brindilles, les herbes, l'écorce, les racines ou les fruits (Burt, 2004). Elles sont présente en petite quantité par rapport à la masse du végétal ; elles sont odorantes et très volatiles, c'est-à-dire qu'elles s'évaporent facilement dans l'air (Bekhechi et Abdelouahab, 2010).

Le volume d'huile essentielle récupéré dépend du rendement de distillation, qui est variable, chez une même plante, en fonction de la saison (Gonny *et al.*, 2004). Les HE peuvent aussi être obtenues par expression à froid, comme pour les agrumes. De nouvelles techniques, permettant d'augmenter le rendement de production, ont été développées, comme l'extraction au moyen de dioxyde de carbone liquide à basse température et sous haute

pression (Santoyo *et al.*, 2005) ou l'extraction assistée par ultrasons ou micro-ondes (Kimbaris *et al.*, 2006).

La composition des huiles essentielles varie en fonction de différents facteurs, incluant le stade de développement des plantes, les organes prélevés, la période et la zone géographique de récolte (Delaquis *et al.*, 2002 ; Gonny *et al.*, 2004 ; Burt, 2004).

Les principaux constituants des huiles essentielles, connues pour leur activité antibactérienne, sont présentés dans le Tableau III.

**Tableau III:** Les principaux constituants des huiles essentielles (HE) à activité antibactérienne (Burt, 2004).

Plante		Composés majoritaires	Composition (%)
Nom commun	Nom latin		
Thym	<i>Thymus vulgaris</i>	Carvacrol	10 à 64
		Thymol	2 à 11
		$\gamma$ -terpinène	2 à 31
		p- cymène	10 à 56
Romarin	<i>Rosmarinus officinalis</i>	$\alpha$ -pénème	2 à 25
		Acétate de bornyle	0 à 17
		Camphre	2 à 14
		1,8-cinéole	3 à 89
Clou de girofle	<i>Syzygium aromaticum</i>	Eugénole	75 à 85
		Acétate d'eugényle	8 à 15
Coriandre	<i>Coriandrum sativum</i>	Linalol	26% (feuilles) ; 70% (graines)
Cannelle	<i>Cinnamomum zeylandicum</i>	Trans-cinnamaldéhyde	65
Origan	<i>Origanum vulgare</i>	Carvacrol	Traces à 80%
		Thymol	Traces à 64%
		$\gamma$ -terpinène	2 à 52
		p- cymène	Traces à 52%
Sauge	<i>Salvia officinalis L.</i>	Camphre	6 à 15
		$\alpha$ -pénème	4 à 5
		$\beta$ -pénème	2 à 10
		1,8-cinéole	6 à 14
		$\alpha$ -thujone	20 à 42

Les HE possèdent en commun un certain nombre de propriétés physiques (Brunetton, 1999) :

- Ce sont des substances de consistances huileuses, plus au moins fluide, très odorantes et volatiles ;
- Elles sont solubles dans l'alcool, l'éther, le chloroforme, les huiles fixes, les émulsifiants et dans la plus part des solvants organiques ;
- Elles sont très peu solubles dans l'eau mais entraînable à la vapeur d'eau ;
- Leurs densité est inférieure à celle de l'eau, en générale, elle varie de 0.75 à 0.99 ;
- Elles ont un indice de réfraction élevé ;
- Quelques fois incolores, elles peuvent au contraire être vivement colorées (en rouge pour la cannelle, en bleu pour la camomille, etc.) (Wichtl, 2003) ;
- Volatiles, contrairement aux huiles fixes et aux graisses ;
- Elles sont très altérables, sensibles à l'oxydation (mais ne rancissent pas). Elles ont tendance à se polymériser. Elles sont donc de conservation limitée.

La diversité moléculaire confère aux HE des rôles et des propriétés biologiques très variés. De nombreuses HE, comme les huiles de cannelle, de piment, de laurier et d'origan, présentent un pouvoir antioxydant (Mantle *et al.*, 1998 ; Karioti *et al.*, 2006). Un effet anti-inflammatoire a été décrit pour les HE de *Protium strumosum*, *Protium lewellyni*, *Protium grandifolium* (Siani *et al.*, 1999), ou, plus récemment, pour HE des racines de *Carlina acanthifolia* (Dordevic *et al.*, 2007), qui est capable d'inhiber l'inflammation induite par une injection de carraghénane chez le rat. Les activités antifongiques de nombreuses huiles essentielles, incluant les huiles de thym, de citronnelle, de cannelle et de l'arbre à thé ont été décrites (Burt, 2004).

### I.2.2.3. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont définis comme des substances azotées, basiques, d'origine naturelle, de distribution restreinte et ayant une structure complexe. Leur atome d'azote est incluse dans un système hétérocyclique et ils possèdent une activité pharmacologique significative. Ils existent à l'état de sels, mais ils ne sont pas tous dérivés des acides aminés, et ainsi quatre groupes sont reconnus (Summer *et al.*., 2006; Yongru *et al.*, 2011) :

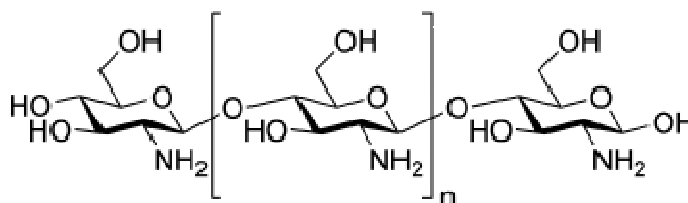
- Les alcaloïdes dérivés des acides aminés comme l'ornithine, arginine, lysine, histidine, phénylalanine, tyrosine, tryptophane, l'acide anthranilique ou nicotinique ;
- Alcaloïdes purines, comme la xanthine et la caféine ;
- Terpènes aminés, ex : diterpène aconitine ou triterpène solanine ;
- Alcaloïdes poly-cétoniques où l'azote est inclus dans le squelette poly-cétonique comme la coniine et la coccinelline.

### I.2.3. Les agents antimicrobiens naturels d'origine animale

#### I.2.3.1. Le chitosane

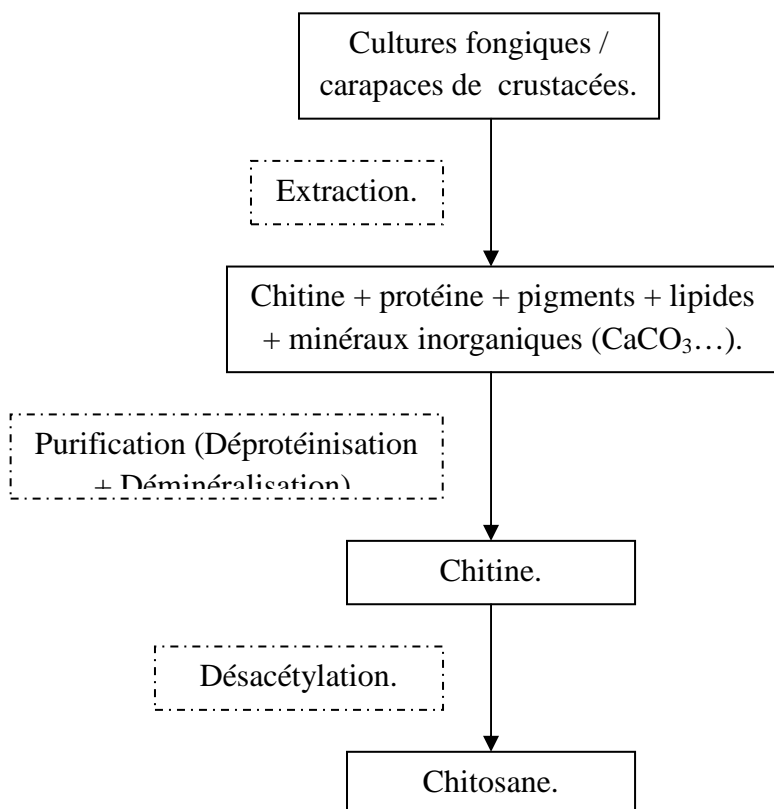
Le chitosane est un polysaccharide linéaire dérivé de la chitine, la composante principale d'exosquelette des arthropodes, de l'endosquelette des céphalopodes et des cuticules des insectes. (Tolaimate *et al.*, 2003).

La structure moléculaire de chitine consiste en un enchaînement linéaire d'unités N-acétyl- $\beta$ -D-glucosamine liées en 1-4. Le chitosane ne diffère de la chitine que par les groupements amines ( $-\text{NH}_2$ ), chargés positivement (Figure 1). Ces derniers lui confèrent une nature cationique, intéressante dans un milieu acide et sont, également, responsables de son activité floculante. Le chitosane comporte plus d'un centre réactif, grâce à ses fonctions alcool et amine (Shahidi and Abuzaytoun, 2005).



**Figure 1:** Structure chimique du chitosane (Zemmouri, 2014).

Le chitosane est le produit de la désacétylation (enlèvement groupements acétyles) chimique en milieu alcalin ou enzymatique de la chitine. Cette dernière subie au préalable une déminéralisation à l'acide chlorhydrique, une déprotéinisation par la soude ou la potasse, et enfin un blanchiment par la présence d'un agent oxydant (Figure 2). En jouant sur la durée du traitement alcalin et sur la température, il est possible d'obtenir différents types de chitosane à partir d'une même chitine (Tolaimate *et al.*, 2003).



**Figure 2:** Production de la chitine et du chitosane (Shahidi and Abuzaytoun, 2005).

Le chitosane est caractérisé par son degré de désacétylation (DD), sa viscosité et son poids moléculaire. Le degré de désacétylation est le pourcentage molaire de l'élimination des groupements N-acétyl. Ce paramètre influe sur toutes les propriétés physico-chimiques (masse moléculaire en poids, viscosité, solubilité, ...) du chitosane.

La viscosité du chitosane dépend : de son degré d'acétylation (plus il est désacétylé, plus il y a de groupements amine libres, plus le chitosane est soluble, et plus sa viscosité est importante), de sa concentration, de la température, et le pH.

Le chitosane est un polymère cationique en milieu acide. Ce caractère conduit à la mucoadhésivité de ce polymère et à des interactions électrostatiques fortes (complexes électrostatiques) avec les tensio-actifs de charge opposée, avec de nombreuses protéines et avec les lipides (Rinaudo, 2013).

Le chitosane est biocompatible et biodégradable par les microorganismes possédant des enzymes qu'on appelle chitosanase. Le chitosane a des propriétés inhibitrices sur la croissance de nombreux parasites et agents infectieux. De plus, il a des propriétés immunologiques, anti-tumorales, antibactériennes et antifongiques (Shahidi and Abuzaytoun, 2005).

Parmi les effets négatifs du chitosane sur la santé humaine, on cite : la perturbation de l'absorption des vitamines liposolubles A, D, E et K, de certains minéraux (le zinc) et de substances comme les flavonoïdes (EFSA, 2014).

#### **I.2.4. Les acides organiques**

Les acides organiques sont des composés chimiques de faible poids moléculaire se caractérisant par la présence d'au moins une fonction carboxylique (Plassard et Fransson, 2009). Ils sont produits naturellement par les micro-organismes, les plantes, les animaux et les êtres humains. Les acides organiques les plus courants sont les acides carboxyliques qui sont principalement employés dans l'industrie alimentaire comme additifs alimentaires et sont utilisés comme agent de conservation, acidulant ou antioxydant.

La production industrielle des acides organiques a débuté avec la production d'acide citrique à partir de citrons ainsi que la production d'acide malique à partir de pommes (Tomic, 2010). Ces molécules peuvent également être produites par les micro-organismes, comme le champignon filamenteux *Aspergillus*.

La production, par fermentation, d'un acide organique dépend du micro-organisme utilisé mais aussi de la régulation de paramètres physico-chimiques tels que l'oxygénation, la température, le pH et l'agitation.

La production d'acides organiques est généralement réalisée par fermentation en milieu liquide (Magnuson et Lasure, 2004), mais ils peuvent également être produits par fermentation en milieu solide, en l'occurrence les acides citrique, lactique et gluconique (Soccol, 2008).

A titre d'exemple, l'acide citrique est un acide alpha hydroxylé de formule  $C_6H_8O_7$ , c'est un intermédiaire du cycle de Krebs. Il est produit par les agrumes (citrons ou oranges) ou par les micro-organismes (fermentation par *Aspergillus niger*) (Papagianni, 2007). Il est largement utilisé dans l'alimentation, comme additif alimentaire, conservateur et exhausteur de goût, mais aussi dans la composition des détergents et des cosmétiques (Krishna, 2005).

### **I.3. Les agents antimicrobiens synthétiques**

#### **I.3.1. Les antibiotiques synthétiques et semi synthétiques**

L'apparition de souches bactériennes multi-résistantes suite à une accumulation de résistance naturelles et acquises, liée à l'usage intensif et inapproprié d'antibiotiques, a amené les chercheurs à modifier la structure chimique de certains antibiotiques et à synthétiser chimiquement des molécules analogues ayant un mode d'action différent de celui des antibiotiques naturels afin de palier à ce phénomène de résistance (Gill, 2008).

### I.3.1.1. Les antibiotiques synthétiques

Ce sont des produits entièrement obtenus par voie chimique, exemple des sulfamides, de l'acide nalidixique et des fluoroquinolones (Weston, 2002).

### I.3.1.2. Les antibiotiques semi synthétiques

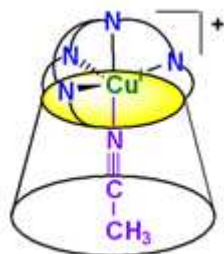
Ces antibiotiques sont obtenus à partir d'une fraction moléculaire naturelle sur laquelle a été greffé un radical chimique, comme la méticilline qui est synthétisée à partir de la pénicilline (Fournier, 2006).

## I.3.2. Les complexes chimiques

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 Figure 3 illustre un modèle de complexe métallique à base de cuivre.



**Figure 3:** Schéma montrant un modèle de complexe chimique à base de cuivre (Walton, 1998).

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).

Certains complexes chimiques sont à base de cuivre. Le cuivre est un élément métallique de symbole Cu, naturellement présent dans la croûte terrestre. C'est un métal rouge orange, brillant, noble et peu oxydable. Il possède une excellente conductivité thermique et

électrique. En solution, le cuivre se retrouve généralement à deux degrés d'oxydation: +I et +II (Hakimi *et al.*, 2008).

Le cuivre est, comme le fer, un élément indispensable à de nombreux processus vitaux. Il est le coenzyme de nombreuses métalloprotéines comme l'acide ascorbique oxydase et la tyrosinase, mais son rôle principal est la stimulation de la synthèse de l'hémoglobine (Prunet *et al.*, 1996).

Le cuivre est transporté par la circulation sanguine au moyen d'une protéine nommée céruléoplasmine, il est, ensuite, acheminé vers le foie où il se lie à l'albumine. Il est excrété dans la bile (Hilgers *et al.*, 2003).

Les principales propriétés physico-chimiques du cuivre sont présentées dans le Tableau IV.

**Tableau IV:** Propriétés physico-chimiques du Cuivre (DAVID, 2009).

Propriété	Cuivre
Classification périodique	IB
Numéro atomique	29
Masse volumique (g/cm <sup>3</sup> ) à 20°C	8.96
Masse atomique (g/mol)	63.54
Couche externe électronique	4s <sup>2</sup> 3d <sup>9</sup>
Rayon ionique (nm)	0,075
Volume molaire (cm <sup>3</sup> /mol) à 20°C	7,11
Electronégativité de Pauling	1,9
Energie de première ionisation (kJ/mol)	178
Energie de fusion (kJ/mol)	13,05
Energie de vaporisation (kJ/mol)	300,3
Pression de vapeur (Pa)	0,0505 (1084,4 °C)

L'intoxication à ce métal peut induire une hépatite grave. L'intoxication au cuivre d'origine alimentaire est très rare, elle est due le plus souvent à l'eau de boisson (Hilgers *et al.*, 2003).

Les complexes de cuivre (I) peuvent être classés en trois grandes familles : les complexes anioniques, les clusters neutres et les complexes cationiques. Généralement, les complexes anioniques ne présentent pas de propriétés photo-physiques intéressantes puisqu'ils ne sont pas luminescents. Par contre, les clusters neutres et les complexes cationiques possèdent des propriétés photo-physiques très riches. Les clusters neutres sont caractérisés par une variété de niveaux électroniques d'où peut se produire l'émission (Imahori *et al.*, 1996 ; Liddell *et al.*, 1994).

### I.3.3. Les désinfectants et les antiseptiques

Les antiseptiques et les désinfectants sont des agents antimicrobiens chimiques dont la toxicité est brutale et peu sélective vis-à-vis des cellules procaryotes et eucaryotes. Leur emploi est limité soit à un usage externe *in vivo* (antiseptiques), soit à une désinfection des surfaces inertes (désinfectants) (Boonaert et Rouxhet, 2000).

Le spectre d'activité des principales familles de désinfectants et d'antiseptiques est résumé dans le Tableau V.

**Tableau V :** Spectre d'activité des principales familles de désinfectants et d'antiseptiques (CCLIN, 2000).

Les désinfectants et les antiseptiques								
Famille	Spectre d'activité							
	Bactéries		Mycobactéries	Levures	Moisissures	Virus nus	Virus enveloppés	Spores
	Gram +	Gram -						
<b>HALOGÉNÉS CHLORÉS</b> (eau de Javel)	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>ALDÉHYDES</b> (glutaraldéhyde...)	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>OXYDANTS</b> (acide peracétique)	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>BIGUANIDES</b>	+	+	+/-	+	+/-	+/-	+	-
<b>ALCOOLS</b> (éthanol)	+	+	+	+/-	+/-	+/-	+	-
<b>PHÉNOLS</b>	AV	AV	AV	AV	AV	AV	AV	-
<b>TENSIO-ACTIFS</b> (ammoniums quaternaires)	+	+/-	-	+	+	+/-	+	-

**Légende :** + : Produits actifs ; +/- : Produits inconstamment actifs ; - : Produits inactifs ; AV : activité variable selon les composés.

### I.4. Avantages et inconvénients de certains agents antimicrobiens

Les avantages et les inconvénients de certains agents antimicrobiens sont indiqués dans le Tableau VI.

**Tableau VI :** Avantages et inconvénients notables des certains agents antimicrobiens (FONG *et al.*, 2011).

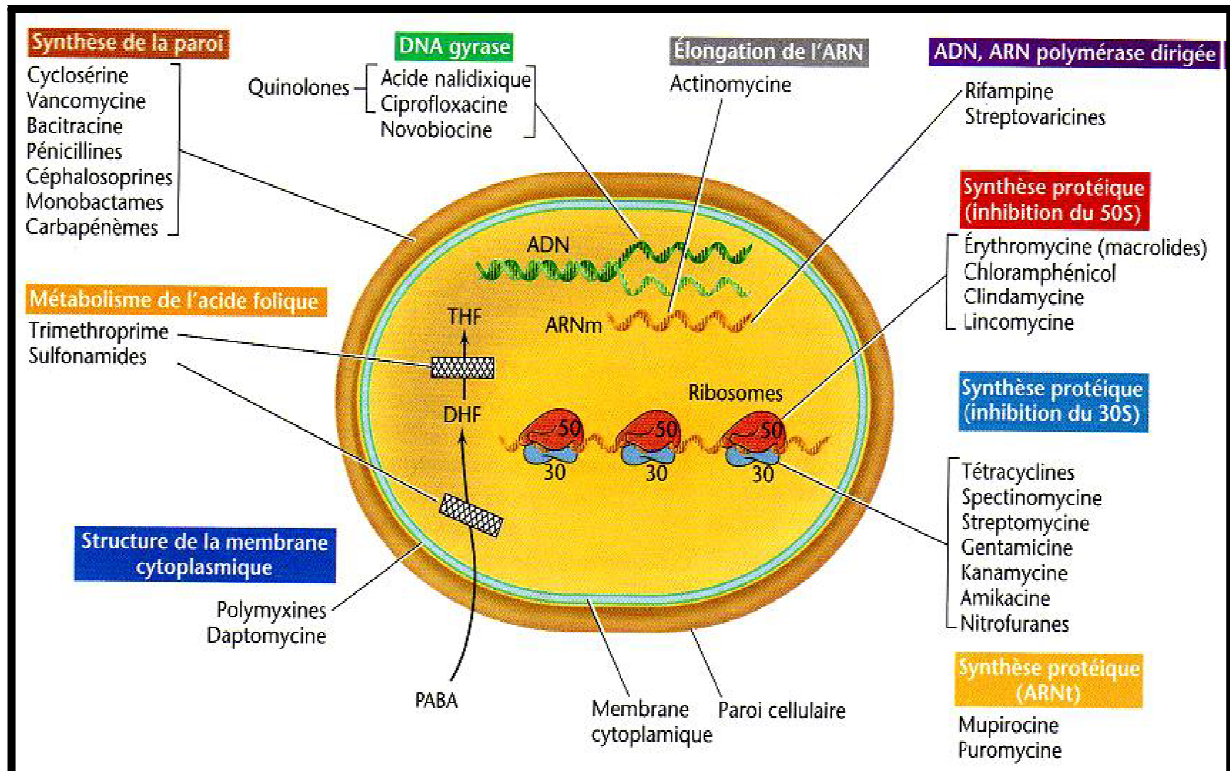
Agent antimicrobien	Avantages	Inconvénients	Conclusions
<b>Huile de thym</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Produit naturel.</li> <li>• Figure dans la liste des produits généralement reconnus comme inoffensifs (G.R.A.S.) du Code de réglementation fédérale des États-Unis.</li> <li>• Faible toxicité.</li> <li>• Écologique.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Certaines bactéries sont résistantes à l'huile de thym.</li> <li>• Le thymol est classé comme asthmogène par « Association of Occupational and Environmental Clinics (AOEC). »</li> <li>• Coûteux.</li> <li>• Nécessite un temps de contact élevé (10 min).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Propriétés antimicrobiennes prometteuses pour l'emploi comme assainissant.</li> <li>• Coût élevé pouvant limiter son emploi dans les applications à grande échelle.</li> </ul>
<b>Cuivre</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Usages existants du cuivre dans les installations d'eau potable, les piscines et les dispositifs médicaux.</li> <li>• De nombreuses applications potentielles (nanotechnologies).</li> <li>• Activité antimicrobienne résiduelle démontrée.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Activité antimicrobienne lente.</li> <li>• Découverte récente de micro-organismes résistants.</li> <li>• Interférence des protéines et des sels de cuivre.</li> <li>• Perte des propriétés antimicrobiennes lorsque tous les ions ont été libérés.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La recherche indique de nombreuses applications potentielles comme agent antimicrobien.</li> <li>• D'autres recherches sont nécessaires pour définir les paramètres d'efficacité.</li> <li>• Les applications pourraient être limitées à l'activité antimicrobienne résiduelle.</li> </ul>
<b>Acide citrique, Acide acétique et Bicarbonate de soude.</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Produits naturels.</li> <li>• Faciles à obtenir et abondants.</li> <li>• Faible toxicité.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Efficacité antimicrobienne limitée et spectre étroit.</li> <li>• Peuvent détériorer les propriétés organoleptiques des produits.</li> <li>• Peuvent être corrosif ou irritant.</li> <li>• Odeurs fortes et indésirables.</li> <li>• Les mélanges d'acides et d'eau de Javel peuvent dégager du chlore gazeux.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Applications limitées par une faible efficacité antimicrobienne et des questions de confort.</li> <li>• Utilisation dans la préparation de produits désinfectants.</li> <li>• Emploi peu probable dans les applications industrielles, mais possibilité d'usage domestique.</li> </ul>

## *Chapitre II:*

# *Mécanismes d'action des agents antimicrobiens*

## I. Mécanismes d'action des antibiotiques

Les antibiotiques sont destinés à agir sur les bactéries à des concentrations compatibles avec la vie de l'hôte, mais suffisantes pour perturber le métabolisme des pathogènes, voire les détruire. Pour cela, ces antibiotiques doivent se fixer sur certaines structures vitales de ces microorganismes, comme la paroi bactérienne, le système nucléaire, la membrane cytoplasmique et les ribosomes.



**Figure 4 :** Mécanismes d'action des agents majeurs chimio-thérapeutiques antibactériens (Singh et Barrett, 2006).

### I.1. Antibiotiques agissant sur la synthèse de la paroi bactérienne

Les antibiotiques agissant par ce mécanisme sont ceux de la famille des  $\beta$ -lactamines. Ces antibiotiques sont bactéricides, car ils inhibent la synthèse de la paroi bactérienne. Les transpeptidases et les carboxypeptidases, enzymes associées à la membrane cytoplasmique, fixent ces antibiotiques. Cette liaison est due à une analogie structurale entre le substrat naturel de ces enzymes, l'acyl-D-alanyl-D-alanine et le cycle  $\beta$ -lactame (Blumberg et Strominger, 1974 ; Weston, 2002). Ces enzymes qui se lient aux pénicillines et aux céphalosporines, sont également dénommées protéines de liaison aux pénicillines (PLP). (Gill, 2008).

**I.2. Antibiotiques altérant la perméabilité de la membrane plasmique**

Les antibiotiques ayant ce mode d'action appartiennent à la série chimique des polygynies. Ils se fixent sur certains constituants des membranes interne et externe des bactéries (phospholipides, lipopolysaccharides) et modifient la perméabilité de ces structures (Poole, 2002).

**I.3. Antibiotiques agissant sur les acides nucléiques****I.3.1.**

Les sulfamides, les quinolones et les rifamycines agissent sur les acides nucléiques de la cellule microbienne. Par exemple, les sulfamides bloquent la synthèse cellulaire de l'acide tétra-hydro-folique, molécule qui intervient dans de nombreuses réactions du métabolisme de plusieurs acides aminés et de celui des bases purines et pyrimidines (Poole, 2002). L'action antibiotique des quinolones est due à une inhibition de la réplication de l'ADN bactérien par blocage de l'ADN gyrase. Des concentrations élevées de quinolones inhibent par ailleurs la synthèse des acides ribonucléiques (ARN) (Gill, 2008). Quant aux rifamycines, elles agissent par fixation sur l'une des sous unités de l'ARN polymérase ADN-dépendante. Il s'ensuit un blocage de la transcription de l'ADN en ARN messager (Poole, 2002).

**I.4. Antibiotiques agissant sur les protéines et les enzymes**

Plusieurs familles d'antibiotiques agissent en interférant avec le processus de synthèse protéique dans les bactéries. Ce sont les aminosides, les phénicolés, les tétracyclines, les macrolides, les lincosamides, les streptogramines et l'acide fusidique (Poole, 2002).

A titre d'exemple, les aminosides exercent des interactions sur de multiples sites ribosomaux, certains se fixant à la fois sur les deux sous unités ribosomales. Les phénicolés bloquent la synthèse protéique des bactéries après s'être fixés sur certaines protéines ribosomales de la sous unité 50 S. Ils interagissent d'une part avec le site amino-acyl et d'autre part, ils inhibent l'action de la peptidyl-transférase. Les tétracyclines sont des antibiotiques bactériostatiques inhibant la synthèse protéique bactérienne en interagissant avec certaines protéines de la sous - unité ribosomale 30S. quant aux macrolides, les lincosamides et les streptogramines, soit ils empêchent la fixation de l' amino-acyl-ARN sur le site spécifique A du ribosome (exemple : spiramycine), soit ils inhibent l'activité de la peptidyl-transférase (exemple : streptogramines A), soit ils bloquent la synthèse protéique à l'étape ultérieure de la translocation (exemple : erythromycine).

**II. Mécanismes d'action des bactériocines**

Le site d'action des bactériocines est la membrane cellulaire, raison pour laquelle leur activité contre les bactéries Gram- est limitée. Cependant, les mécanismes d'action des bactériocines sur la membrane sont variés (Ennahar *et al.*, 2000).

### II.1. Action des bactériocines de la classe I : les lantibiotiques

Les lantibiotiques interagissent avec la membrane cellulaire par des interactions électrostatiques ou par liaison à des récepteurs spécifiques tels que le lipide II, un précurseur de peptidoglycanes. Suite à cette liaison, les lantibiotiques peuvent former des pores larges et non spécifiques dans la membrane cytoplasmique, ce qui va causer la perte rapide des petits composés cytoplasmiques (ions, acides aminés, 'ATP, etc). Cette augmentation de la perméabilité membranaire va conduire à la dissipation des deux composantes de la force proton motrice, à la cessation rapide des activités cellulaires et à la mort de la cellule. L'interaction avec le lipide II permet d'augmenter la stabilité des pores formés et de réduire la concentration du lantibiotique nécessaire à la formation des pores, mais peut également conduire à l'inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire (McAuliffe et Hill, 2001 ; Twomey *et al.*, 2002 ; Bauer et Dicks 2005 ; Patton *et al.*, 2005).

Les lantibiotiques de type A dissipent la force proton-motrice par formation de pores et interfèrent avec la synthèse des peptidoglycanes alors que la plupart des lantibiotiques de type B agissent par inhibition de la synthèse des peptidoglycanes (Bauer *et al.*, 2005; Patton *et al.*, 2005).

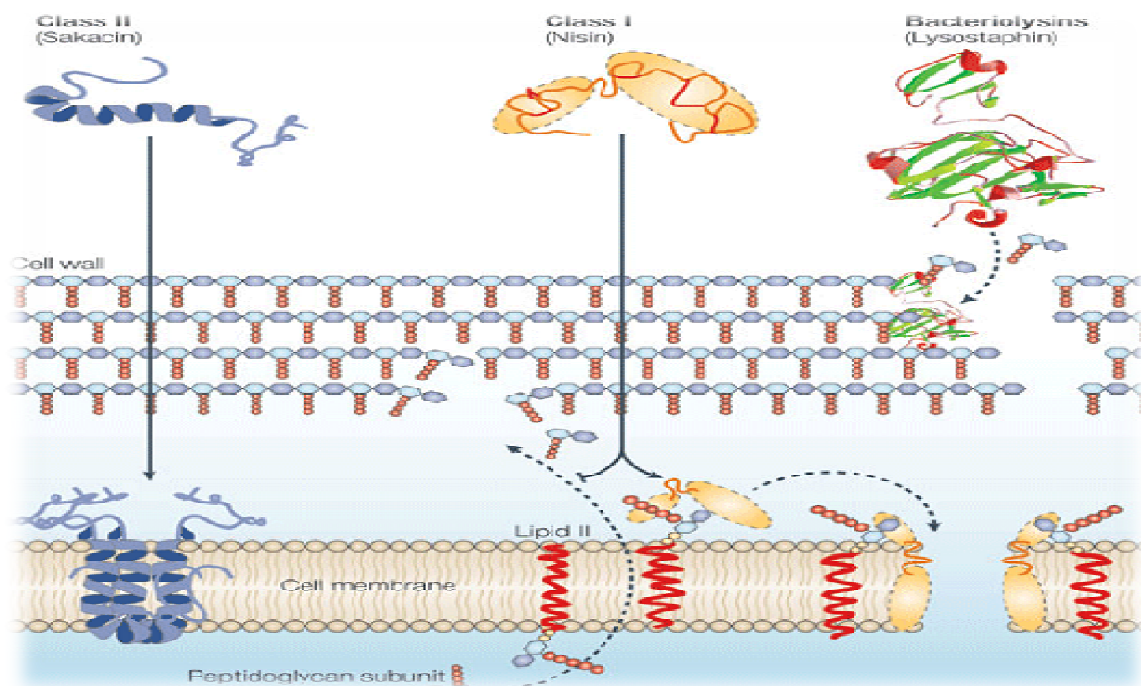
### II.2. Action des bactériocines de classe II

Le mécanisme d'action supposé des bactériocines de classe IIa est l'interaction 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; 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+. 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, 2007). A titre d'exemple, la lactocine 705 $\alpha$  interagit avec la surface de la membrane cellulaire et la déshydrate, ce qui permet à la lactocine 705 $\beta$  de former des pores Castellano (2007).

### II.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).

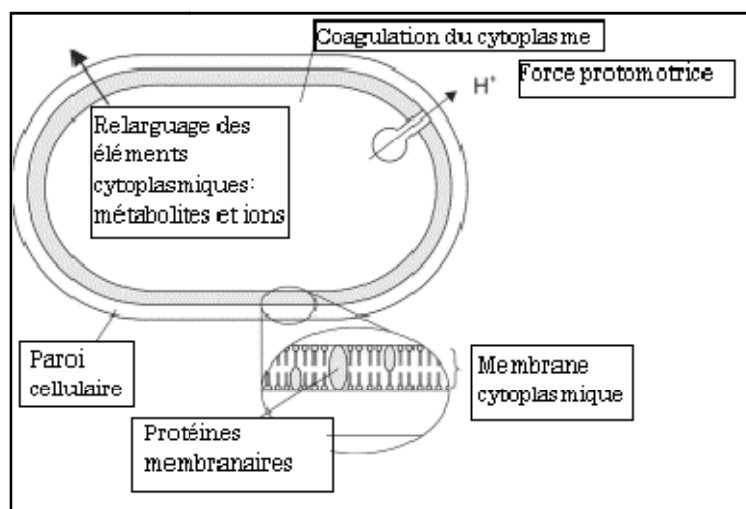


**Figure 5 :** Mode d'action des bactériocines de bactéries lactiques (Cotter *et al.*, 2005).

### III. Mécanismes d'action des huiles essentielles (HE)

#### III.1. Action antibactérienne

Le mode d'action des huiles essentielles sur les cellules bactériennes n'est pas clairement élucidé (Kalemba et Kunicka, 2003 ; Burt, 2004). Compte-tenu de la diversité des molécules présentes dans les huiles, l'activité antibactérienne semble résulter d'une combinaison de plusieurs modes d'action, impliquant différentes cibles cellulaires (Figure 6).



**Figure 6 :** Action des huiles essentielles et de leurs constituants sur la cellule bactérienne (Burt, 2004).

Les HE sont des molécules à caractère lipophile, ce qui leur permet de se répartir dans les lipides des membranes cellulaires bactériennes, et de les désorganiser, augmentant de ce fait leur perméabilité (Oussalah *et al.*, 2006). L'action est légèrement différente pour les bactéries Gram négatif : les composés hydrophobes des HE sont capables de gagner leur périplasme directement par les porines (Helander *et al.*, 1998). On observe alors chez la bactérie une perte plus importante d'électrolytes comme le potassium et le sodium, ainsi qu'une sensibilité accrue aux changements de pH de son milieu de culture (Carson *et al.*, 2002 ; Lambert *et al.*, 2001; Ultee *et al.*, 2002). Si la perte de matériel est trop importante ou si les éléments cytoplasmiques relargués sont indispensables à la survie de la bactérie, cela entraîne la mort cellulaire.

### III.2. Action antifongique

Cox *et al.* (2000) ont rapporté que l'activité antifongique des HE est due à une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique suivie de sa rupture entraînant une fuite du contenu cytoplasmique et donc la mort de la cellule. Les composés terpéniques des HE et plus précisément leurs groupements fonctionnels tels que les phénols et les aldéhydes réagissent avec les enzymes membranaires et dégradent la membrane plasmique de la levure (Glodani et Kaloastran, 2006).

### IV. Mécanismes d'action du chitosane

Le mode d'action du chitosane n'est pas entièrement connu et apparaît complexe. Le chitosane est connu principalement pour ses propriétés chélatantes. Cependant, il possède de bonnes propriétés antimicrobiennes. Celles-ci dépendent de plusieurs facteurs : sa nature, son degré de polymérisation, son origine, la composition du substrat et des conditions environnementales comme, par exemple, l'humidité du substrat (Rabea *et al.*, 2003).

Son action antimicrobienne comporte des effets antifongiques, antibactériens et algicides. Il agit de différentes manières. Il a d'abord un effet inhibiteur sur certaines enzymes. Par ailleurs, son caractère chélatant le conduit à emprisonner des cations métalliques qui limitent la production de toxines et la croissance des micro-organismes. Enfin, les groupements ammonium du chitosane ont des effets bactériostatiques et bactéricides, en particulier s'ils sont quaternaires (Bordenave *et al.*, 2010). Son action bactéricide est optimum pour un pH de 6,0 plutôt que 7,5. Ces conditions permettent une plus grande accessibilité des groupements amines, le pKa du chitosane étant de 6,2 à 7,32.

Ce composé, insoluble dans le vin, possède une action spécifique sur les levures de contamination du genre *Brettanomyces* et n'a aucun impact en conditions de fermentation alcoolique sur les populations de *Saccharomyces cerevisiae* et la cinétique de fermentation alcoolique. Il semble avoir un impact sur les bactéries lactiques. C'est pourquoi son

application est pour l'instant conseillée après la fermentation malolactique (Tolaimate *et al.*, 2003).

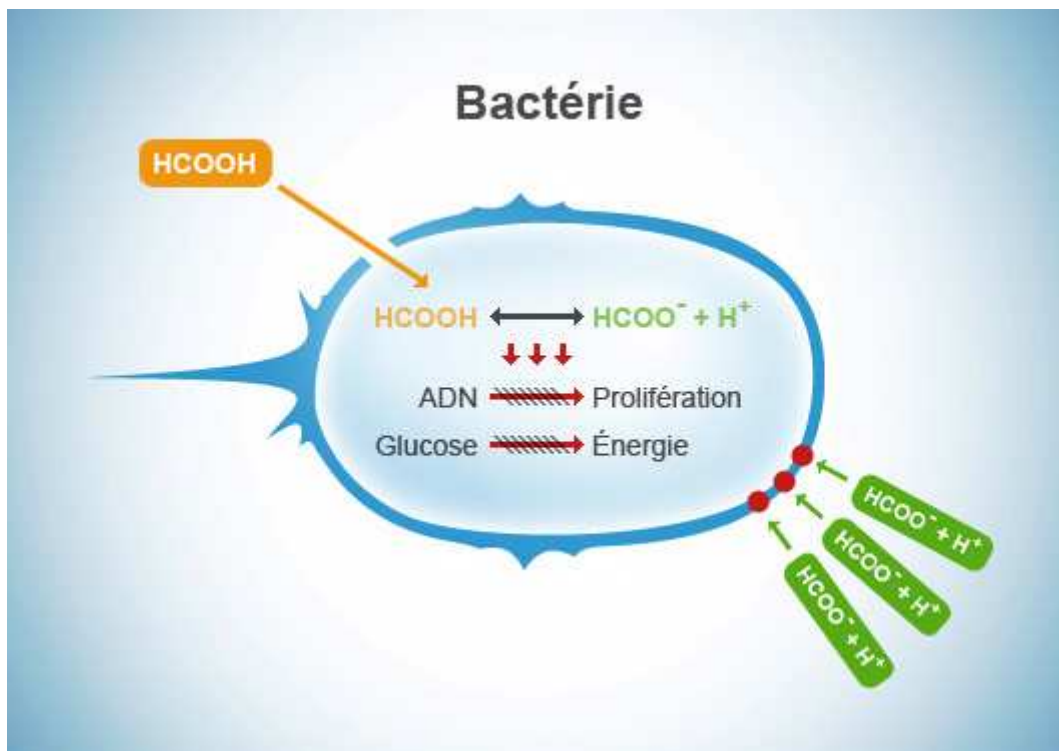
Le mécanisme d'action du chitosane sur les *Brettanomyces* fait l'objet d'hypothèses en cours de validation. Il est vraisemblable qu'il agisse à deux niveaux (OIV, 2009):

- Interactions spécifiques entre certains groupements du chitosane et la membrane cellulaire des *Brettanomyces* qui provoquent une déstructuration de la barrière membranaire induisant une réponse transcriptionnelle de l'expression du génome, telle une réaction de stress, qui conduit à la mort des cellules ;
- Adsorption du chitosane sur les parois de *Brettanomyces* et blocage des transferts entre les milieux intracellulaires et extracellulaires, et entraînement par sédimentation.

## V. Mécanismes d'action des acides organiques

Les acides organiques sont utilisés dans l'alimentation animale pour leur effet antimicrobien prononcé. Ils sont capables d'inhiber ou de bloquer la croissance des bactéries pathogènes ainsi que des moisissures ou levures indésirables (Gouget, 2013).

Le mode d'action antimicrobienne des acides organiques est actuellement présenté comme le résultat de trois effets différents (Figure 7) :



**Figure 7** : Mode d'action antimicrobienne des acides organiques (Gouget, 2013).

Premièrement, l'acidité des acides organiques abaisse le pH de l'environnement de nombreux microorganismes pathogènes ou indésirables de telle sorte que la croissance de ces derniers est impossible ou fortement limitée.

Deuxièmement, les molécules acides non dissociées sont lipophiles et peuvent diffuser passivement à travers la membrane plasmique de certains pathogènes, comme les salmonelles par exemple. À l'intérieur de la cellule, ils acidifient le cytoplasme après dissociation 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 de l'ADN. Le microorganisme ne peut donc plus se multiplier (Chene, 2002 ; Servin, 2004).

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. Bien que les acides organiques soient utilisés dans l'alimentation depuis de nombreuses années, les résistances sont inconnues (Papagianni, 2007).

## VI. 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, c'est à dire les atomes N7 et N1 de l'adénine, N3 de la cystéine et N7 de la guanine. 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.

## VII. Action combinée des agents antimicrobiens

Plusieurs associations d'agents antimicrobiens sont possibles selon les objectifs visés. Par exemple, dans la technologie de conservation des denrées alimentaires, des méthodes conjuguant les agents physiques comme la réfrigération et les agents chimiques comme l'emploi de substances antimicrobiennes sont préconisées par les scientifiques. Une combinaison entre les agents chimiques comme les substances antimicrobiennes d'origine végétale et d'origine microbienne est également possible, ce type de combinaison suscite actuellement un intérêt particulier puisqu'il offre de nombreux avantages comme la réduction de la concentration utilisée et la prévention de la résistance bactérienne, réduction du coût, moins d'effets organoleptiques indésirables.

Certaines publications (Ultee *et al.*, 2000 ; Dimitrijevic *et al.*, 2007 ; Misaghi et Basti 2007 ; Yoon *et al.*, 2011) portent sur le mode d'action des composants d'huile essentielle en combinaison avec d'autres agents de conservation naturels ou des antibiotiques.

Les études de Cox *et al.* (2001) et de Goñi *et al.* (2009) ont porté sur des combinaisons d'agents bactéricides et bactériostatiques, en utilisant et en explorant:

- Des composés qui agissent sur la même cible ;
- Des interactions chimiques parmi les composés tels que la réduction de la solubilité aqueuse de terpène actif par les hydrocarbures monoterpéniques non aqueux.

Zore *et al.* (2011) ont proposé deux hypothèses pour expliquer les effets synergiques de cinnamaldehyde / thymol ou cinnamaldehyde / carvacrol contre *S. typhimurium*:

- Thymol ou le carvacrol pourraient augmenter la perméabilité de la membrane cytoplasmique, et faciliter, probablement, le transport du cinnamaldehyde dans la cellule.
- Thymol ou carvacrol pourraient augmenter le nombre, la taille ou la durée de l'existence des pores créés par la liaison de protéines du cinnamaldehyde dans la membrane cellulaire.

Plus récemment, Fei *et al.* (2011) ont montré que les combinaisons synergiques des HE (origan / basilic contre *E. coli*, basilic / bergamote contre *S. aureus*, origan / bergamote contre *B. subtilis* et origan / perilla contre *S. cerevisiae*) perturbaient de façon significative l'intégrité des membranes cellulaires par rapport aux membranes des témoins traités avec les agents employés seuls.

Les implications pratiques de ces observations sont importantes au moment de l'utilisation des composants d'HE dans les systèmes alimentaires car certains composants d'HE à des concentrations élevées peuvent donner des notes aromatiques indésirables aux aliments (par exemple, l'eugénol).

Toutefois les mécanismes d'interaction qui ont produit des effets antagonistes ont été moins étudiés.

## VIII. Comparaison entre les agents antimicrobiens

### VIII.1. Huiles essentielles versus antibiotiques

Les antibiotiques sont des molécules isolées. On connaît le mode d'action de chacune d'elles : elles agissent sur une partie de l'agent pathogène qu'elles détruisent ou qu'elles inhibent. 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. En effet, en échangeant leur matériel génétique avec leurs consœurs comme elles le font fréquemment (par transformations, transductions et conjugaisons), ces bactéries vont être capables de transmettre la résistance rapidement au sein du pool de bactéries infectant l'organisme traité (Weston, 2002 ; Poole, 2002).

Les HE sont des ensembles très complexes de molécules (plusieurs dizaines, voire centaines) issues de différentes familles chimiques (terpènes, alcools, aldéhydes, phénols, esters pour ne citer que les plus courantes). Leur activité anti-infectieuse résulte bien d'un ensemble d'actions, pour lesquelles chaque molécule va jouer un rôle. 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).

### VIII.2. Bactériocines versus antibiotiques

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. Par exemple, ces derniers peuvent inhiber la synthèse de la membrane cellulaire et des éléments essentiels pour la survie des bactéries tandis que les bactériocines, elles, peuvent former des trous dans la membrane bactérienne (Sass *et al.*, 2008). 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 montré que la mersacidine (bactériocine produite par l'espèce *Bacillus*) était capable d'inhiber la croissance d'une des souches bactériennes résistantes aux antibiotiques la plus problématique (Sass *al.*, 2008).

## *Chapitre III:*

# *Applications industrielles des agents antimicrobiens*

## I. Applications des bactériocines

La première bactériocine a été découverte en 1925 par A. Gratia qui a nommé sa découverte colicine, puisqu'elle tuait uniquement les bactéries de la souche *E. coli*. Cependant, sa découverte fut éclipsée peu de temps après par celle du premier antibiotique, la pénicilline, qui était nettement plus efficace contre tous les types de bactéries. L'émergence de souches de bactéries résistantes a poussé les scientifiques à revoir l'usage des antibiotiques et songer à les remplacer par les bactériocines ou autres antimicrobiens ayant un mode d'action différent (NOVAK *et al.*, 1999 ; Roder, 1999 ; Weigel *et al.*, 2003).

### I.1. Application dans le domaine agroalimentaire

Dans l'industrie agroalimentaire, des restrictions dans l'utilisation des antibiotiques ont été mises en place par plusieurs pays pour essayer de freiner la résistance bactérienne. (Soulsby, 2007). De ce fait, plusieurs compagnies de production se sont tournées vers les bactériocines, comme bio-conservateurs, pour assurer la qualité de leurs produits. Les bactériocines sont, pour la plupart, inodores, sans goût, mais surtout, non toxiques ce qui a mené à leur approbation par la FDA (Food and Drug Administration). Maintenant, les bactériocines prennent une importante partie du marché mondial des suppléments alimentaires (Hassan *et al.*, 2012).

Certaines bactériocines possèdent une activité antimicrobienne plus vaste qui peut même s'étendre jusque chez le protozoaire, la levure, le champignon et le virus (Reddy *et al.*, 2004). Ainsi, en plus de leur utilité dans le domaine agroalimentaire, les bactériocines ont aussi un immense potentiel dans le domaine médical.

À titre d'exemple, la nisine (SIN) 234 est listée comme conservateur au standard international du codex alimentarius (codex 2014). En tant que tel on l'utilise essentiellement dans les fromages et produits fromagers, les crèmes, les gâteaux, les œufs liquides pasteurisés. On l'utilise également dans la mise en conserve de viandes pour inactiver des bactéries nuisibles et dans des boissons, ainsi que comme antimicrobien dans les produits cosmétiques (Gouget, 2013).

### I.2. Applications médicales

L'usage des bactériocines n'est pas restreint au domaine alimentaire. Celles-ci servent aussi comme agents de thérapie naturelle alternatifs aux antibiotiques (Smaoui, 2010). Suite à l'émergence du phénomène d'antibiorésistance manifesté par plusieurs bactéries pathogènes (parmi lesquelles certaines sont résistantes à plusieurs antibiotiques à la fois) qui menace la santé publique, les études sont actuellement orientées vers la recherche de nouvelles substances antibiotiques naturelles pouvant résoudre ce problème (Mkrtchyan *et al.*, 2010).

Les bactériocines de la classe IIa présentent un groupe important de peptides antimicrobiens qui peuvent être utilisés en médecine avec les antibiotiques dans le traitement des maladies infectieuses ou comme des agents antiviraux. Ces molécules ont une activité inhibitrice contre les bactéries à Gram positif nuisibles et pathogènes comme *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes* (Drider et al., 2006).

Zhu et al. (2005) ont rapporté que le Koumiss (produit chinois à base de lait fermenté) est efficace dans le traitement de la tuberculose et des maladies cardiovasculaires et contribue à l'amélioration de l'immunité, et que ces propriétés sont attribuées aux bactériocines produites par les bactéries lactiques indigènes. Dembélé et al. (1998) ont démontré que les bactériocines produites par le genre *Lactobacillus* contribuent à la protection du vagin contre différentes bactéries pathogènes telles : *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Shigella boydii*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Listeria innocua* et *Staphylococcus aureus*. Tong et al. (2010) ont démontré que la nisine participe dans la prévention et le traitement des caries dentaires en inhibant les microorganismes en cause. La nisine est aussi utilisée dans le traitement des ulcères gastriques vu sa stabilité aux pH acides et son activité contre *Helicobacter pylori*. Les bactériocines LA-1, YIT9029 et DCE471 produites par *Lb. johnsonii*, *Lb. casei* et *Lb. amylovorus* respectivement manifestent également une activité inhibitrice contre *Helicobacter pylori* (Smaoui, 2010). Des études récentes ont découvert le rôle des bactériocines produites par *Lactobacillus salivarius* dans la réduction de colonisation du caecal des volailles par *Campylobacter* (Nazef et al., 2008).

Les bactériocines peuvent être intégrées dans les produits à usage quotidien. Certaines bactériocines sont efficaces pour la prévention de caries dentaires ou de la gingivite et peuvent donc être intégrées dans la pâte dentifrice. Certains produits sont déjà commercialisés comme le rince-bouche BLIS K12 qui contient les bactériocines salivaricin A2 et B qui détruisent les bactéries associées à la mauvaise haleine (Tagg, 2004).

Les bactériocines peuvent être utilisées contre n'importe quelle infection ou malaise causés par des bactéries pathogènes comme l'acné, des cas de fibrose kystique, la tuberculose, les otites, les infections mammaires et les vaginites. Plusieurs essais cliniques sont en cours pour rendre ces produits disponibles.

Cependant, beaucoup de bactériocines d'intérêt ont une courte durée de vie chez l'humain. Il existe des moyens pour fabriquer synthétiquement des bactériocines hybrides ou de les modifier afin qu'elles soient capables de résister en augmentant leur stabilité. Par contre, de tels procédés sont très coûteux.

## II. Applications des huiles essentielles

Les HE commercialisées dans le monde sont destinées à quatre grands secteurs industriels : parfumerie cosmétique, parfumerie technique (savons, détergents), alimentation et médecine (médecine douce et pharmaceutique) (Grysole, 2005). L'industrie alimentaire utilise les huiles essentielles pour rehausser le goût, aromatiser et colorer les aliments (Aprotosoia et al., 2010 ; Bruneton, 1999 ; Grysole, 2005 et Pauli et al., 2010). Le secteur des boissons gazeuses s'avère un gros utilisateur d'huiles essentielles (Grysole, 2005).

Les huiles essentielles possèdent des profils de composition chimique différents. Leur utilisation comme agents de conservation est due à la présence de composés ayant des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes (Conner, 1993 ; Hammer *et al.*, 2011). L'huile essentielle la plus utilisée dans le monde est celle de l'orange (Grysole, 2005).

Les huiles essentielles de *Citrus limon* servent à la fabrication d'arômes alimentaires, d'essences fruitées, de boissons rafraichissantes, de liqueurs, de pâtisseries et de confiseries (Choi *et al.*, 2000).

### II.1. Applications alimentaires

Les huiles essentielles peuvent être ajoutées à peu près à tous les aliments. Ainsi, les huiles essentielles d'origan, de thym, de cannelle ou de coriandre sont efficaces pour les viandes, les volailles, les charcuteries et les légumes ; l'huile essentielle de menthe pour les produits frais (salades, yaourts...) ; les huiles essentielles à base de carvacrol ou de citral pour les poissons ; les huiles essentielles de thym, de noix de muscade ou de gingembre pour les céréales (plus particulièrement celles riches en carvacrol pour le riz) ; et les huiles essentielles à base de carvacrol ou de cinnamaldéhyde pour les fruits.

Toutefois, les huiles essentielles utilisées comme agents de conservation peuvent affecter la qualité des aliments traités par leurs effets organoleptiques indésirables (cas du pouvoir aromatisant des HE). Des techniques de désaromatisation existent et sont de plus en plus efficaces. Les effets organoleptiques indésirables des HE peuvent être limités en sélectionnant soigneusement l'huile essentielle selon le type d'aliment considéré, mais il est important de noter, que dans la plupart des cas, les concentrations d'huiles utilisées sont si faibles, qu'elles ne modifient pas les qualités organoleptiques de l'aliment.

Un autre aspect à prendre en compte, c'est de vérifier que l'huile essentielle sélectionnée n'a pas d'effet antimicrobien contre les bactéries utiles, notamment les ferments d'acidification, d'aromatisation et d'affinage, indispensables à la fabrication des produits, ainsi que la flore intestinale du consommateur. Moyennant ces précautions d'usage, l'emploi des huiles essentielles lors de la transformation des aliments peut présenter un triple intérêt: aromatisant, antioxydant et antimicrobien.

Elles sont aussi utilisées dans les préparations culinaires, assaisonnement à l'huile végétal additionnée d'huile essentielle (thym, basilic, romarin, origan), parfum de desserts (huiles essentielles d'agrumes, vanille. etc.) (Degryse *et al.*, 2008). De même, elles sont ajoutées aux pâtisseries, condiments, et aux boissons gazeuses ou alcooliques, et utilisées dans les emballages de conservation de denrées alimentaires (Turgeon, 2001).

### II.2. Autres utilisations

Les huiles essentielles entrent dans la fabrication de produits pharmaceutiques, en raison de leurs propriétés thérapeutiques et dans celle des parfums, des produits de toilette, des cosmétiques, des savons et des détergents, en raison de leurs propriétés aromatiques (Turgeon, 2001).

### III. Applications du chitosane

Grace à ses propriétés biologiques, le chitosane est un biopolymère très intéressant trouvant des applications dans plusieurs domaines tels que l'agriculture, l'agroalimentaire, la médecine, la cosmétologie, le textile et le traitement des eaux usées (Neetu *et al.*, 2006; Theruvathil *et al.*, 2007).

#### III.1. En agriculture

Le chitosane peut être utilisés comme insecticides naturels (Jun Cai *et al.*, 2006), comme agents de conservation des fruits et légumes (fraises, poivrons, concombres et tomates) (El-Ghaout *et al.*, 1992) et comme engrais biologiques. En effet, suite à l'ajout de matière organique chitineuse, les feuilles et les tiges de soja accumulent plus d'azote.

#### III.2. En traitement des eaux usées

Grâce à de sa grande capacité d'adsorption, le chitosane est utilisé comme agent de chélation des cations et des ions métalliques à savoir  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  et  $\text{Cu}^{2+}$  (Hu *et al.*, 2004). Ils sont également utilisés pour traiter les effluents, de l'industrie textile, riches en colorants par adsorption et par coagulation-floculation (Kurita, 1997).

#### III.3. En médecine

Le chitosane possède des capacités cicatrisantes (Koide, 1998), immunologiques, anti-tumorales (Koide, 1998), hémostatiques et anticoagulantes (Benesch, 2001 ; Jayakumar *et al.*, 2006 ; Preyanat *et al.*, 2003). Le chitosane est également utilisé en ophtalmologie comme véhicule pour la mise au point d'hydrogels ophtalmiques (Felt, 1999 ; Morfin *et al.*, 2002).

#### III.4. En agroalimentaire

Dans le domaine agroalimentaire, ce biopolymère présente des atouts particulièrement intéressants (Agulló *et al.*, 2003 ; Shahidi *et al.*, 1999) :

- Propriétés antimicrobiennes permettant au film alimentaire d'être bio-préservant et comestible ;
- Propriétés antioxydantes entraînant une activité antioxydante sur le vin, la viande et les produits de la mer ;
- Fibres alimentaires permettant la capture des acides gras libres à pH bas et la baisse de l'absorption des lipides ce qui lui confère des propriétés nutraceutiques utiles pour l'amincissement ;
- Texturants permettant la stabilisation des émulsions et des mousses et servant d'épaississant ;
- Augmentation de la durée de vie des produits carnés notamment des viandes marinées bovines conditionnées sous atmosphère modifiée.

### III.5. Autres applications

Le chitosane peut être utilisé dans d'autres domaines tels que la cosmétologie pour la fabrication des crèmes hydratantes et amincissantes, l'industrie papetière pour la fabrication de la cellulose, en microbiologie comme sources de carbone et pour la production de chitinases, en biotechnologie pour l'encapsulation et l'immobilisation des enzymes (Jinjiang, 1996 ; (Suresh et Chandrasekaran, 1998; Jun Cai *et al.*, 2006, Chang et al., 2006).

## IV. Applications de l'acide citrique

Les principales applications de l'acide citrique dans les différents secteurs industriels sont les suivantes :

### IV.1. Boissons et aliments

Il est utilisé principalement comme agent acidulant, comme correcteur de la sapidité et comme agent conservateur et additif alimentaire (Pressindustria, 2004).

### IV.2. Pharmaceutique, cosmétique et hygiène du corps

Il trouve des applications dans la préparation de diverses formes pharmaceutiques effervescentes en association avec une source de carbonate ou bicarbonate ; en même temps, on exploite ses propriétés antimicrobiennes (Pharmacopée Européenne, 2004). Dans l'industrie cosmétique et pour l'hygiène de corps, il est utilisé comme antioxydant et régulateur de pH (CMR, 2004).

### IV.3. Autres utilisations

Les solutions qui contiennent de l'acide citrique sont largement employées pour l'enlèvement des oxydes métalliques de la surface des métaux ferreux et non ferreux et comme agent antitartre dans les chaudières (CMR, 2004). Il trouve beaucoup d'autres applications dans l'agriculture, dans le placage électrolytique des métaux, dans la photographie, dans la préparation de certains plastifiants et comme composant des résines alkydes (Pressindustria, 2004).

Les sels de l'acide citrique d'importance commerciale sont :

- Le citrate dibasique d'ammonium ;
- Le citrate de calcium ;
- Le citrate de fer-ammonium ;
- Le citrate de potassium ;
- Le citrate de sodium.

Le citrate de sodium est le plus largement utilisé et sa consommation augmente sans cesse dans le secteur des détergents comme remplaçant efficace biodégradable des polyphosphates et des zéolithes (Blair et Staal, 1993). Il est aussi utilisé dans les secteurs alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques (Rohr *et al.*, 1993).

## V. Applications des complexes chimiques

Les complexes métalliques ont une importance capitale en chimie et interviennent dans beaucoup de domaines d'avant-garde.

### V.1. Les complexes métalliques en catalyse

La configuration des ligands autour d'un centre métallique, la possibilité d'échanger des ligands et la capacité de certains métaux à s'insérer dans des liaisons covalentes (en particulier les liaisons multiples) de façon réversible rend les complexes métalliques extrêmement utiles en catalyse. En effet, la coordination à un centre métallique abaisse l'énergie d'activation de réaction par formation d'un ou plusieurs complexes intermédiaires et influe sur la sélectivité de la réaction. Dans la nature, il y a aussi des complexes métalliques qui interviennent dans les métalloprotéines (fer dans l'hémoglobine, magnésium dans la chlorophylle, cuivre dans l'hémocyanine...). Ces complexes sont un des objets d'étude de la chimie bio-inorganique (Bartlett, 2010).

### V.2. Les complexes en chimie des solutions

Les complexes en chimie des solutions ont des utilités multiples :

- 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).

### V.3. En médecine

Des complexes de platine sont utilisés dans le traitement de certains cancers (cis-platine, carbo-platine, oxali-platine...) (Losada, 2001).

La capacité complexant de l'EDTA est mise à profit dans le traitement d'intoxication par des métaux, en particulier le plomb.

### V.4. Autre utilisations

Le complexe  $\text{Fe}(\text{CO})_5$  liquide à température ambiante permet d'obtenir par distillation du fer très pur.

*Deuxième partie:*  
*Etude expérimentale*

# *Matériel et Méthodes*

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

L'objectif de cette étude est :

- ☞ Evaluation du pouvoir inhibiteur de la croissance bactérienne fongique de quatre agents antimicrobiens à savoir : l'H.E.T, l'acide citrique, le chitosane et une quinzaine de complexes chimiques produits au laboratoire de la chimie de coordination de la faculté des sciences - Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou.
- ☞ Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI), ainsi que les concentrations minimales bactéricides (CMB) et fongicides (CMF).
- ☞ Etudier les interactions entre les agents antimicrobiens actifs par combinaison deux à deux et déterminer les concentrations sub-inhibitrices.

### A. Matériels

#### I. Matériel biologique

##### I.1. Souches microbiennes testées

Le choix des souches microbiennes testées dans cette étude a été basé sur l'implication dans la pathologie humaine et l'altération des aliments. Pour cela nous avons sélectionné : une bactérie à Gram+, une bactérie à Gram-, une levure et une moisissure.

##### I.1.1. Les souches bactériennes

Les souches bactériennes utilisées dans cette étude sont *Bacillus subtilis* ATCC 6633 et *Escherichia coli* ATCC8739. Ces souches microbiennes de référence sont choisies en fonction de leur pathogénicité et leurs résistances aux antibiotiques et implication dans les intoxications alimentaires. Elles ont été aimablement fournies par le laboratoire de microbiologie de la société pharmaceutique (Aldaph-Novonordisk) sise à la zone industrielle Oued-Aissi de Tizi Ouzou.

##### I.1.2. Les souches fongiques

Les souches fongiques utilisées dans cette étude appartiennent aux espèces *Candida albicans* et *Aspergillus niger*.

La levure provient d'un prélèvement vulvaire effectué au laboratoire de mycologie du CHU Nedir Mohammed de Tizi Ouzou.

La moisissure a été isolée d'une variété de blé dur (vitron) au département des sciences biologiques et des sciences agronomiques de l'université de Laghouat.

## **I.2. Les agents antimicrobiens testés**

### **I.2.1. Les complexes chimiques**

Les complexes chimiques testés ont été élaborés et caractérisés par l'équipe du Pr ADKHIS, laboratoire de chimie de coordination, département de chimie - Université M. Mammeri de Tizi Ouzou.

Les complexes chimiques ont été conservés sous forme cristalline solide à l'abri de la lumière, ils sont insolubles dans l'eau c'est pourquoi ils sont mis en solution dans le Di-Méthyl-Sulfoxyde (DMSO). Afin d'obtenir des concentrations assez suffisantes pour provoquer une activité antimicrobienne, les complexes ont été préparés à 10mg/ml.

Les différents complexes ainsi que leurs ligands sont reportés dans le Tableau VII.

**Tableau VII : Les complexes chimiques testés et leurs ligands**

Molécule	Désignation	Structure chimique	Poids moléculaire (g/mol)	Couleur	
<b>COMPLEXES CHIMIQUES</b>	<b>Cpx1</b>	[Cu (Hdmg) (Arg) (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)]	495,76	Noir	
	<b>Cpx 2</b>	[Cu (Hdmg) (Arg) (Br) <sub>2</sub> ]	513,56	Olive	
	<b>Cpx 3</b>	[Cu (Hdmg) <sub>2</sub> (Glu) (NO <sub>3</sub> )]	503,71	Noir	
	<b>Cpx 4</b>	[Cu (Hdmg) <sub>2</sub> (Glu) (SCN)] NO <sub>3</sub>	562,71	Marron	
	<b>Cpx 5</b>	[Cu (Hdmg) (Pro) (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]	570,71	Vert foncé	
	<b>Cpx 6</b>	[Cu <sub>2</sub> (Hdmg) (Ade) <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) (H <sub>2</sub> O)]	466,88	Rouge indien	
	<b>Cpx 7</b>	[Cu <sub>2</sub> (Hdmg) (Gua) (NO <sub>3</sub> ) (H <sub>2</sub> O)]	622,23	Olive	
	<b>Cpx 8</b>	[Cu (Hdmg) (Ade) (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]	438,69	Vert foncé	
	<b>Cpx 9</b>	[Cu (Hdmg) (Gua) (NO <sub>3</sub> )]	391,69	Vert clair	
	<b>Cpx 10</b>	[Cu (H <sub>2</sub> dmg) (OPD) (NO <sub>3</sub> )]	348,70	Marron	
	<b>Cpx 11</b>	[Cu (H <sub>2</sub> dmg) (OPD) (Br) <sub>2</sub> ]	447,50	Marron	
	<b>Cpx 12</b>	[Cu (Hdmg) (Val) (NO <sub>3</sub> ) (H <sub>2</sub> O)]	393,17	Marron	
	<b>Cpx 13</b>	[Cu (Hdmg) (Lys-Cl) <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> )]	605,86	Marron	
	<b>Cpx 14</b>	[Cu (Trp) <sub>2</sub> (Hdmg)]	761,24	Olive	
	<b>Cpx 15</b>	[Cu <sub>2</sub> (His) (Hdmg) (NO <sub>3</sub> )]	608,23	Vert foncé	
<b>LIGANDS</b>	<b>Eléments chimiques</b>	<b>Sel de cuivre</b>	Cu (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>3</sub>	241,61	-
		<b>Hdmg=diméthyl-glyoxime</b>	HON=C(CH <sub>3</sub> ) C(CH <sub>3</sub> )=NO <sup>-</sup>	116,02	-
		<b>NO<sub>3</sub>=nitrate</b>	NO <sub>3</sub>	62	-
		<b>Br=brome</b>	Br	79,90	-
		<b>OPD=ortho-phénylène diamine</b>	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	108,1	-
		<b>H<sub>2</sub>O</b>	Eau	18	-
	<b>Acides aminés</b>	<b>Arg = arginine</b>	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	174,20	-
		<b>Glu=glutamate</b>	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>4</sub>	147,13	-
		<b>Val=valine</b>	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	117,15	-
		<b>Lys-Cl=lysine-chloridrique</b>		182,65	-
		<b>Trp=tryptophane</b>	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	204,2252	-
		<b>Pro=proline</b>	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	115,13	-
		<b>His=histidine</b>	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	155,1546	-
	<b>Bases azotées</b>	<b>Ade=adénine</b>	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N <sub>5</sub>	135,13	-
		<b>Gua=guanine</b>	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N <sub>5</sub> O	151,13	-

### I.2.2. L'huile essentielle de thym (HET)

Dans le présent travail, nous avons utilisé de l'huile essentielle de thym (*Thymus vulgaris*) commerciale 100% pure, référencée : THILL-S NR1, SDZ et certifiée par Ecocert SAS F 32600(ISO). Cette huile est naturelle, issue de l'agriculture biologique, achetée à la société française FLORAME. Elle a été conservée en position verticale, à l'obscurité et au frais (réfrigération).

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

**Tableau VIII:** Profil chromatographique de l'huile essentielle de *thymus vulgaris* (seuls les composés de pourcentage supérieur à 0,05 % ont été rapportés).

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

10.587	Oxyde de linalol	0.07
11.320	Terpinolène	0.38
11.825	Cis 4-Thujanol	0.13
12.049	Linalol	5.68
14.106	Camphre	0.40
15.354	Bornéol	1.90
15.996	Terpinèn-4-ol	1.07
16.887	$\alpha$ - Terpinéol	0.11
18.801	Acétate de bornyle	0.12
19.906	Thymol méthyl éther	0.47
22.820	Carvacrol méthyl éther	0.24
23.554	Thymol	45.85
23.863	Isothymol (Carvacrol)	3.17
30.140	$\beta$ -Caryophyllène	1.54
31.263	Alloaromadendrène	0.16
34.621	Lédène	0.12
36.368	$\gamma$ -Cadinène	0.14
39.525	Oxyde de caryophyllène	0.25

L'huile essentielle de *Thymus vulgaris* n'étant pas miscibles dans l'eau, il était nécessaire d'utiliser un émulsifiant pour la réalisation de dilutions de cette huile. Il s'agit du Diméthyl-Sulfoxyde (DMSO), un liquide organique hautement polaire et miscible à l'eau.

### **I.2.3. Le chitosane**

Le chitosane utilisé dans cette étude est aimablement fourni par Dr Kadouche Slimane, il est produit au niveau du laboratoire de chimie de l'environnement, du département de chimie - Université M. Mammeri de Tizi Ouzou. La chitine dont il est issu est extraite à partir des carapaces de crevettes roses.

Le chitosane se présente sous forme de poudre inodore, sans saveur et de couleur blanche. La poudre est pratiquement totalement insoluble en milieu aqueux (CODEX, 2009).

Quatre (04) échantillons, ayant des degrés de désacétylation différents : 1h30, 2h00, 2h30 et 3h00, nous ont été fournis et testés. Ils sont respectivement désignés Chito1.3, Chito2.0, Chito2.3, Chito3.0.

Les échantillons testés sont dilués dans de l'acide acétique pure à raison de 2 g/l.

### **I.2.4. L'acide citrique**

Nous avons utilisé de l'acide citrique issu de processus industriel qui se présente sous forme de cristaux blanchâtres.

La dilution est réalisée dans de l'eau distillée stérile. Nous avons préparé des solutions à différentes concentrations : 10% (correspondant à 10 g d'acide citrique dans 100 ml de l'eau distillée stérile), 8%, 6%, 4% et 3%.

## **I.3. Matériel du laboratoire (voir annexes I et II).**

## **II. Etude préliminaire (screening)**

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

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

Chacune des deux souches a été repiquée sur le milieu MH et incubées à 37°C afin d'obtenir des cellules jeunes de 15 à 18 heures. Une coloration simple au bleu de méthylène et une coloration différentielle de Gram ont été réalisées suivies 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 annexe III).

## II.2. Préparation de l'inoculum

### II.2.1. Préparation de préculture

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 10ml de l'eau physiologique stérile à 0,9%, puis homogénéiser. Les suspensions bactériennes, ainsi obtenues, sont standardisées, à l'aide d'un spectrophotomètre, à une DO de 0,08 à 0,10 à une longueur d'onde de 620nm. Cette absorbance correspond à une concentration de  $10^7$  UFC/ml. Nous avons, ensuite, réalisé une dilution au 1/10 afin d'obtenir une suspension standardisée à  $10^6$  UFC/ml.

## II.3. Evaluation qualitative et quantitative de l'activité antimicrobienne

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a été réalisée par la méthode des puits décrite par Ismail *et al.* (2008).

### II.3.1. Activité antibactérienne

Les différents échantillons d'agents antimicrobiens sont utilisés pour tester leurs activités antibactériennes vis-à-vis des deux souches bactériennes choisies.

#### II.3.1.1. Méthode des puits

La méthode des puits consiste à estimer l'inhibition de la croissance des germes testés au contact des différents échantillons d'agents antimicrobiens étudiés.

À partir d'une suspension bactérienne standardisée à  $10^6$  UFC/ml, nous avons effectué un ensemencement en masse en déposant 1ml de la suspension au fond de boîtes de Pétri stériles, puis nous avons coulé la gélose MH en surfusion (45°C environ).

Après solidification, 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 50µl 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 : l'augmentin (AMC), l'imipénème (IPM), nitrofurantoïne (F), pefloxacin (PEF), ceftioxime (FOX), et la cefazoline (KZ) ont été réalisés afin de servir de témoins positifs pour comparer les résultats. Aussi, un puits contenant du DMSO a été prévu en guise de témoin négatif.

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 agents antimicrobiens est classée comme suit :

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

Sensible si :  $9 \text{ mm} < \odot < 14$  mm ;

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

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

## II.3.2. Activité antifongique

### II.3.2.1. Confirmation des souches fongiques

L'identification des souches fongiques fait appel aux caractères culturels (identification macroscopique) et à la morphologie (observation microscopique) de la souche isolée à l'état pur (Botton *et al.*, 1999).

#### II.3.2.1.1. Caractères macroscopiques et microscopiques

L'examen macroscopique d'*Asp. niger* et de *C. albicans* a été fait sur milieux Sabouraud incubés à 25°C et à 37°C respectivement.

Les colonies de *C. albicans* sont plates, luisantes, crémeuses et de couleur blanc crème.

*Asp. niger* forme des colonies atteignant 4 à 5 cm de diamètre en 7 jours. La colonie est d'abord blanche et translucide puis devient noire en sporulant.

Un prélèvement d'un fragment mycélien et d'une colonie de levure sont faits, puis, les échantillons sont placés entre lame et lamelle et observés au microscope photonique au G×400.

#### II.3.2.2. Repiquage de disques mycéliens sur milieu Sabouraud

À partir des boîtes de Pétri conservées contenant la moisissure, trois disques mycéliens d'environ 4mm de diamètre ont été prélevés puis déposés en forme de triangle dans une boîte de

Pétri préalablement coulée de milieu Sabouraud. Ensuite, incubé à 25°C jusqu'à ce que la croissance mycélienne soit bien caractérisée (trois jours).

### **II.3.2.3. Préparation des suspensions à 10<sup>6</sup> UFC/ml**

Les spores d'une jeune culture d'*Asp. niger* sont récupérées par un lavage de la boîte de Pétri avec un volume de 5ml d'eau physiologique stérile à 0.9%.

À l'aide d'une pipette Pasteur stérile, nous avons prélevé une colonie isolée de *C. albicans*, puis on décharge la pipette dans 10ml d'eau physiologique à 0,9%.

Après homogénéisation, les suspensions sont standardisées à 10<sup>6</sup> UFC/ml en effectuant des dénombrements sur la cellule de Thoma et des dilutions décimales, si nécessaire.

### **II.3.2.4. Méthode des puits**

Les mêmes opérations sont effectuées pour tester l'activité antifongique sur *Asp. niger* et *C. albicans*, sauf que dans ce cas, le milieu utilisé est le milieu Sabouraud. L'ensemencement est réalisé en surface en déposant 0,1ml de la suspension fongique sur le milieu préalablement coulé et solidifié, puis étalement à l'aide d'un râteau.

La lecture est faite après 72 heures d'incubation à 25°C pour la moisissure et après 24 heures d'incubation à 37°C pour la levure.

## **III. Détermination des CMI**

### **III.1. Préparation des dilutions**

Les dilutions de l'HET et des complexes chimiques sont réalisées dans le DMSO tandis que celles de l'acide citrique sont effectuées dans l'eau distillée stérile.

L'échantillon de chitosane à 2h30, étant le seul à présenter une activité antimicrobienne, est sélectionné pour déterminer les CMI.

### **III.2. Méthode des spots**

#### **☞ Principe de la méthode**

Ce test non quantitatif 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, nous avons fait couler 15ml de milieu (MH pour les bactéries et Sabouraud pour les souches fongiques) qui va servir d'apport en nutriments pour les microorganismes ;

- Réaliser une dilution volume à volume : dans 3ml du milieu de culture, nous avons mélangé 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, nous avons déposé 3 spots de 5µl de la suspension microbienne à  $10^6$  UFC/ml en forme de triangle.

Les boîtes sont, ensuite, incubées à 37°C pendant 24h pour les bactéries et la levure et à 25°C pendant 72h pour la moisissure.

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

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

La détermination des concentrations minimales bactéricide (CMB) et fongicide (CMF) 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, déposé en stries sur le milieu de culture approprié (MH pour les bactéries et Sabouraud pour les souches fongiques) 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 pour les bactéries et la levure et à 25°C pendant 72h pour la moisissure.

#### **V. Combinaisons**

##### **V.1. Association de l'HET et les complexes chimiques**

Nous avons mélangé 50% de l'HET pure et 50% des complexes chimiques dotés d'une activité antimicrobienne, pour un volume final de 50 µl. Ensuite, nous avons testé l'activité du mélange par la méthode des puits sur les souches bactériennes et fongiques.

La lecture des résultats s'effectue après incubation des souches et consiste en la mesure des diamètres des zones d'inhibition. L'interaction est considérée comme positive lorsque le diamètre d'inhibition dépasse 10 mm.

##### **V.2. Association de l'acide citrique et les complexes chimiques**

Nous avons effectué cinq dilutions de l'acide citrique : 10%, 8%, 6%, 4% et 3%. Puis, nous avons mélangé 50% de complexe chimique avec 50% de chacune des cinq dilutions pour un volume finale de 50 µl. Ensuite, nous avons testé l'activité des mélanges obtenus par la méthode des puits sur les différentes souches testées dans cette étude.

La lecture des résultats s'effectue après incubation des souches et consiste en la mesure des diamètres des zones d'inhibition.

### V.3. Association de l'HET et l'acide citrique

Nous avons préparé des dilutions successives (par facteur de deux) en ce qui concerne l'HET et cinq dilutions de l'acide citrique. Puis, nous avons réalisé des associations entre les différentes dilutions. Enfin, les différents mélanges ont été testés sur les souches choisies pour cette étude.

La lecture des résultats s'effectue après incubation des souches et consiste en la mesure des diamètres des zones d'inhibition.

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

# *Résultats et Discussions*

## I. Criblage des substances antimicrobiennes (screening)

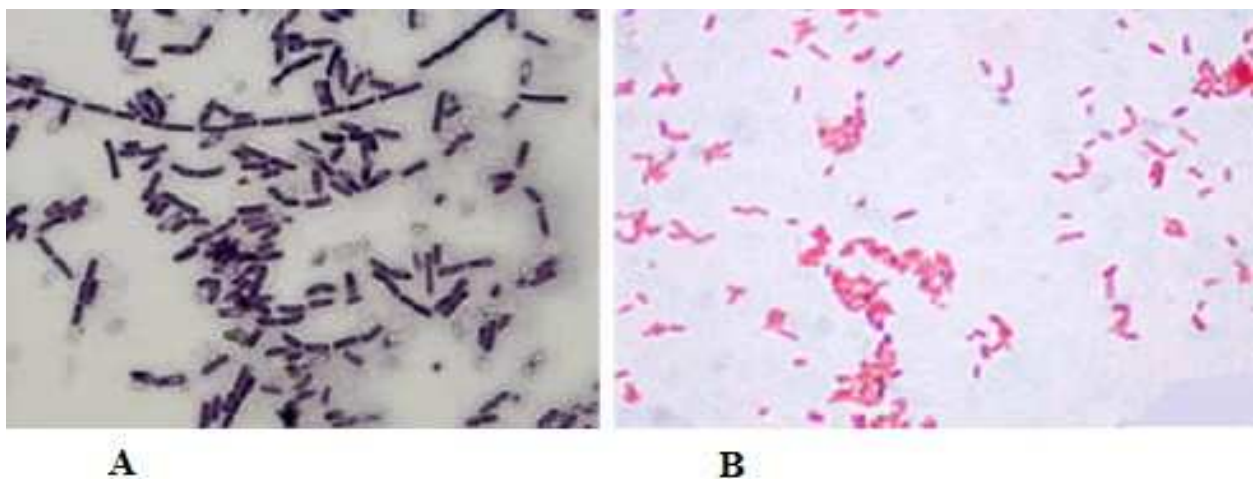
### I.1. Activité antibactérienne

L'étude *in vitro* de pouvoir antimicrobien d'un agent d'origine végétal (HET), un agent d'origine animal (chitosane) et deux agents chimiques (acide citrique et complexes métallique à base de cuivre) par la méthode des puits en utilisant le milieu MH pour les bactéries et le milieu Sabouraud pour les souches fongiques a conduit à l'obtention des résultats illustrés dans des tableaux ou figures. L'activité antimicrobienne 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.

Les cellules d'*E. coli* observées sous forme de coccobacilles, cellules isolées, se sont révélées Gram négatif (coloration rose), alors que les cellules de *B. cereus* se présentaient sous forme de long bacilles, cellules isolées révélés à Gram positif.



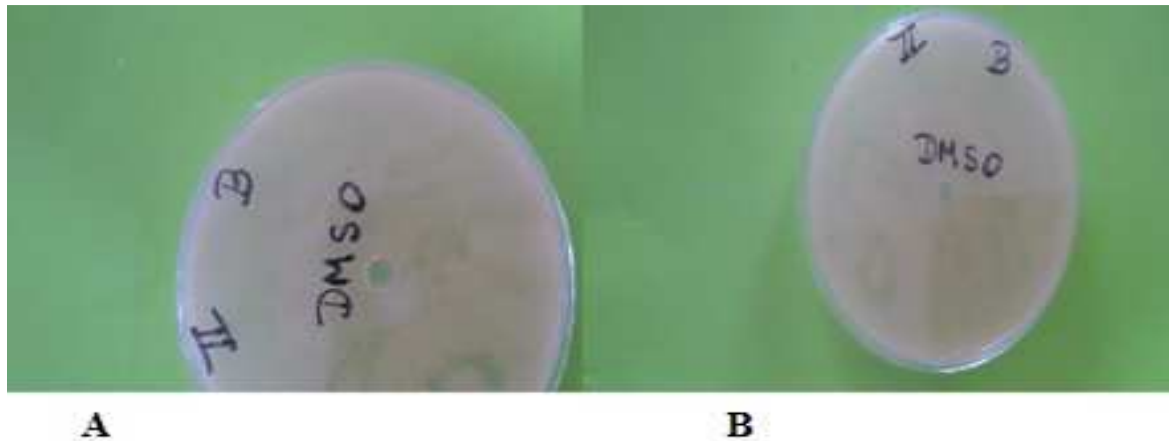
**Figure 8:** Résultats de la coloration de Gram observée au G×1000 à l'immersion. (A) *B. cereus* (B) *E. coli*.

### I.1.2. Résultats du témoin négatif

Si les complexes doivent être soumis aux essais biologiques, la toxicité du solvant peut également être critique car même en traces, le solvant ne devrait pas empêcher le procédé biologique. L'attention doit également être prêtée aux interactions possibles entre le solvant et

les corps dissous pendant que le solvant peut réagir avec certains composés pour causer la dissociation, la déshydratation ou l'isomérisation de ces complexes (Yrjöen, 2004).

Pour cela, le DMSO a été testé comme solvant. Les résultats montrent qu'il est approprié et ne présente aucun effet sur la croissance normale des souches microbiennes (Figure 9).

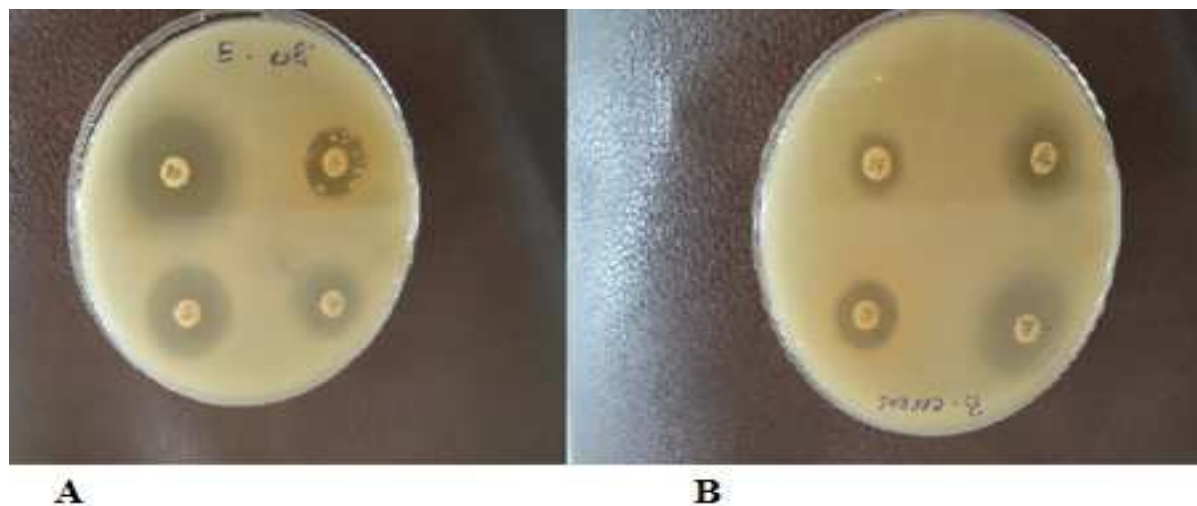


**Figure 9:** Effet du DMSO sur les bactéries étudiées (A) *B. cereus* (B) *E. coli*.

Ainsi, l'effet antimicrobien additionnel éventuel du DMSO se trouvant dans les échantillons serait nul.

### I.1.3. Résultats du témoin positif

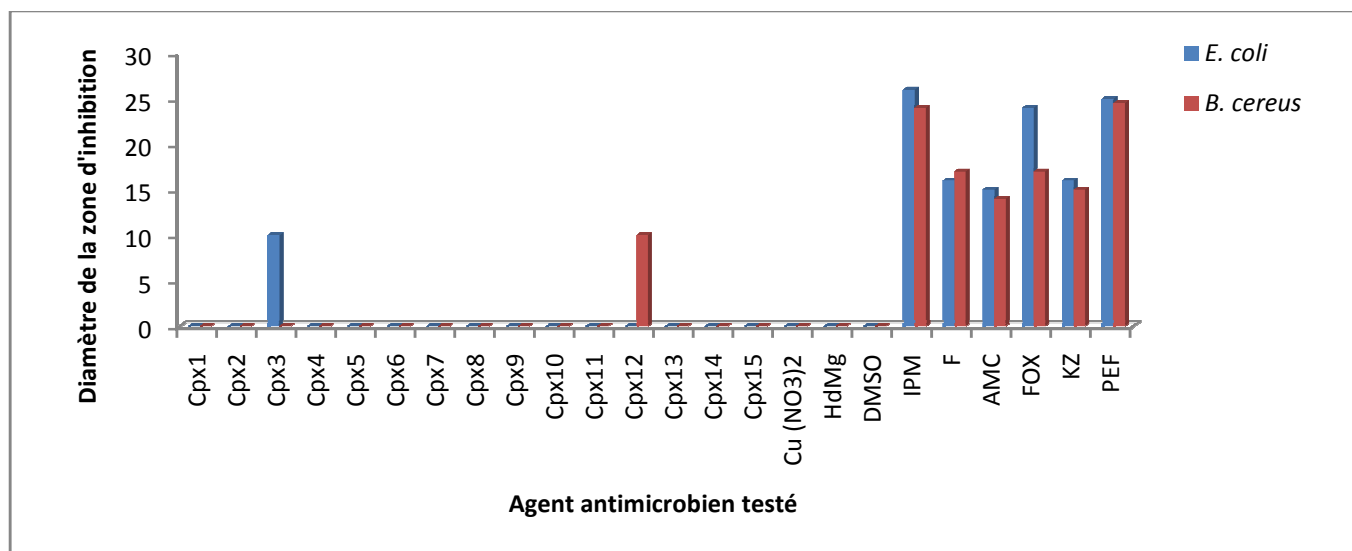
L'antibiogramme a pour but de prédire la sensibilité d'un microorganisme vis-à-vis d'un ou de plusieurs antibiotiques. Cette sensibilité est exprimée par l'apparition des zones d'inhibition autour des disques. Le choix des antibiotiques est lié à leur fréquence d'utilisation en milieu hospitalier. Les résultats sont illustrés par les photos présentées dans la Figure 10.



**Figure 10:** Effet des antibiotiques de référence sur les bactéries étudiées (A) *E. coli* (B) *B. cereus*.

#### I.1.4. Résultats du screening des complexes chimiques sur les bactéries

Les résultats du test préliminaire des complexes chimiques sur les bactéries sont représentés dans l'histogramme (Figure 11).



**Figure 11:** Criblage des complexes chimiques sur la base de leur pouvoir antibactérien.

IPM : imipénème

F : nitrofurantoïne

AMC : augmentin

FOX : cefoxitine

KZ : cefazoline

PEF : pefloxacine

Ces résultats montrent que les ligands testés seuls ainsi que la plupart des complexes chimiques testés ne sont pas actifs sur les souches étudiées. Ceci s'est traduit par le développement des bactéries sur toute la surface de la gélose et même à l'intérieur des puits.

Toutefois, le Cpx3 a produit un effet inhibiteur sur la croissance de *E. coli* en exhibant une zone d'inhibition d'un diamètre de 10 mm (Figure 12 A).

De même, le Cpx12 s'est montré actif vis-à-vis de *B. cereus*. Le diamètre de la zone d'inhibition étant de 10 mm (Figure 12 B).



**Figure 12:** Effet inhibiteur des complexes chimiques sur la croissance des bactéries testées (A) *E. coli* (B) *B. cereus*.

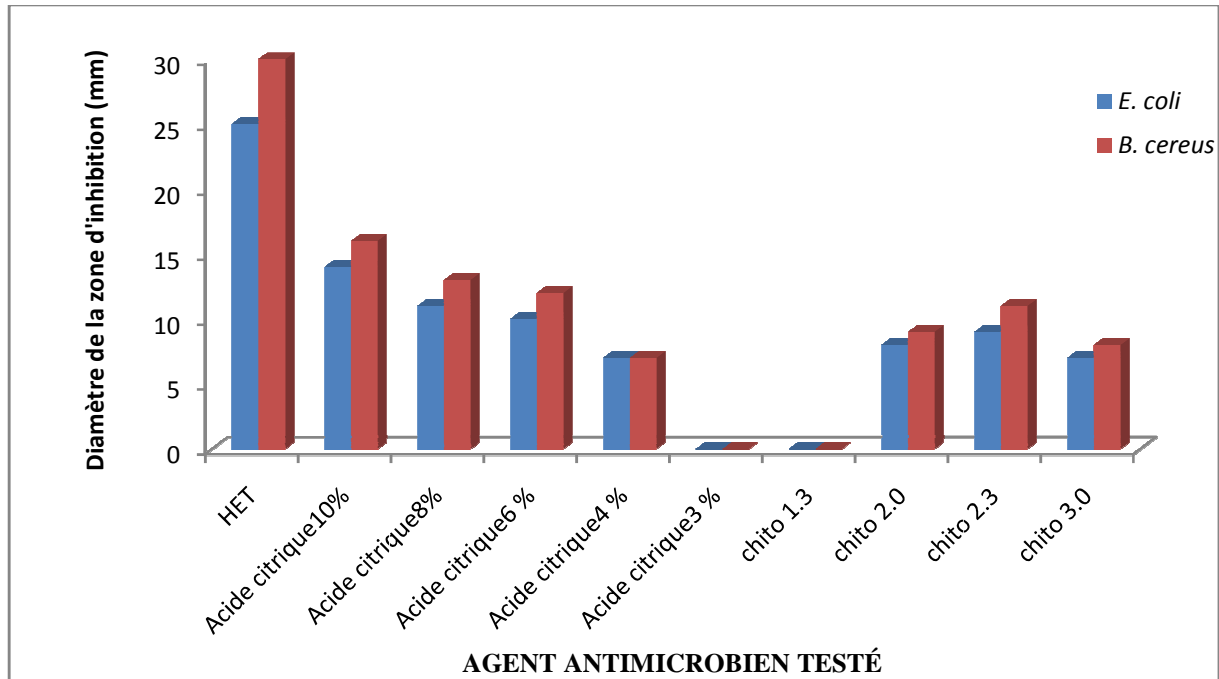
Nos résultats correspondent à ceux obtenus par plusieurs auteurs (Caleb Noble Chandar *et al.*, 2011; Chevry, 2011 ; Mansouri et Akrouf, 2014). Par contre des études récentes (Osunlaja, 2009 et Raman *et al.*, 2014) ont démontré que la quasi-totalité des complexes métalliques à base de cuivre présentent une activité antibactérienne importante vis-à-vis de certaines souches pathogènes y compris *E. coli*. Cette différence de résultats est peut être due à la différence des techniques utilisées ou à la concentration des échantillons.

Le mécanisme d'action des complexes chimiques n'est pas encore très élucidé, cependant, nous pensons que l'activité de ces complexes est liée à leur configuration spatiale ainsi qu'au type de ligands les composants.

### I.2.2. Effet antibactérien de l'HET, de l'acide citrique et du chitosane

Dans cette partie, nous avons testé l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de thym pure, les cinq dilutions de l'acide citrique et les quatre échantillons du chitosane.

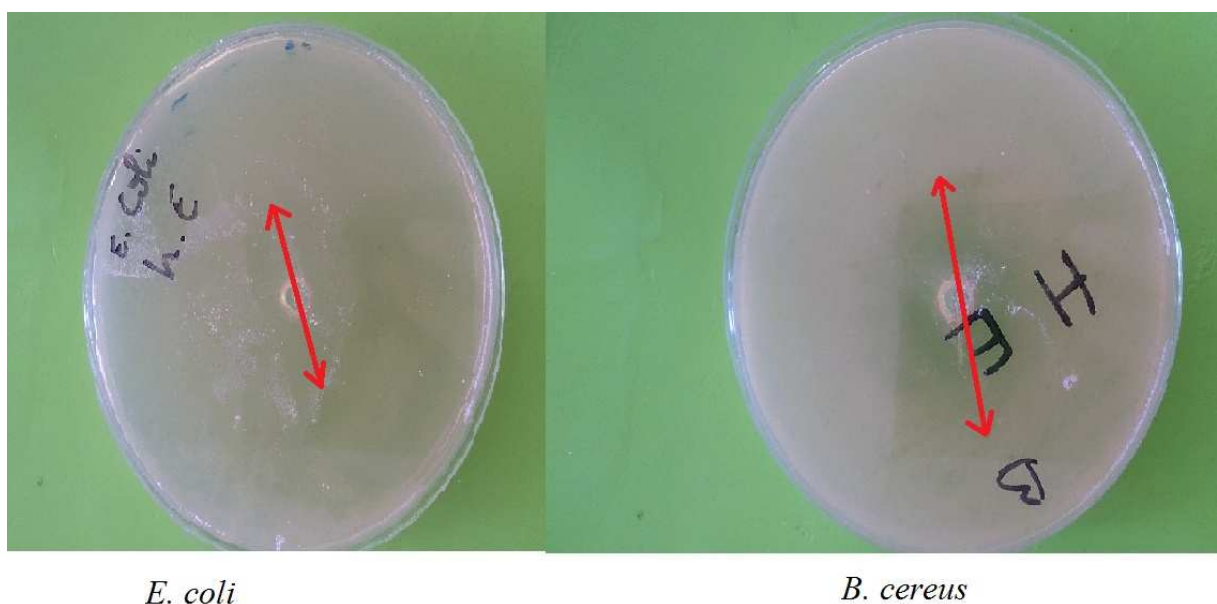
Les résultats de ce test sont représentés dans l'histogramme indiqué dans la Figure 13.



**Figure 13:** Effet inhibiteur de l'HET, de l'acide citrique et du chitosane sur la croissance d'*E. coli* et de *B. cereus*.

D'après l'histogramme présenté dans la Figure 13, les agents antimicrobiens étudiés sont doués d'une activité inhibitrice variable selon la bactérie testée. *B. cereus* semble être plus sensible par rapport à *E. coli* vis-à-vis de l'ensemble des échantillons testés.

La sensibilité la plus élevée (diamètre=30 mm) est observée chez *B. cereus* traitée avec l'HET. De même, *E. coli* est classée extrêmement sensible à l'HET (diamètre=25 mm). Les zones d'inhibition observées sont illustrées par les photos présentées dans Figure 14.



**Figure 14:** Effet de l'HET sur les souches bactériennes.

Selon Sarker *et al.* (2005), l'activité antimicrobienne d'une huile essentielle est probablement due à la présence de synergies entre un nombre de composants, qui, lorsqu'ils sont séparés deviennent inactifs individuellement. Cela est interprété par le fait que les plantes produisent une variété énorme de petites molécules antimicrobiennes ayant un large spectre de structure telles que les terpénoïdes, les alcaloïdes et les polyphénols. Cependant, la plupart de ces molécules ont une faible activité par rapport aux antibiotiques naturels produits par les bactéries et les champignons.

Plusieurs travaux ont mis en évidence la grande sensibilité des bactéries Gram+ par rapport aux Gram- (Falleh *et al.*, 2008 ; Hayouni *et al.*, 2007 ; Kone *et al.*, 2004 ; Shan *et al.*, 2007 ; Turkmen *et al.*, 2007 ). En effet, la force et le spectre de l'activité antimicrobienne varient selon le type de l'HE et le Gram des bactéries. La résistance, généralement, élevée chez les Gram-, est attribuée à la présence d'une membrane externe imperméable aux composés lipophiles. 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 (Wendakoon et Sakaguchi, 1995).

Le mode d'action de certaines molécules antibactériennes (carvacrol et thymol) contenues dans l'HET a été décrit dans la littérature. Le carvacrol et le thymol semblent capables d'augmenter la perméabilité membranaire (Lambert *et al.*, 2001). En détruisant la membrane externe des bactéries Gram négatives, ils augmenteraient la perméabilité de la membrane plasmique aux métabolites cellulaires (Helander *et al.*, 1998).

Le mode d'action du carvacrol a été bien étudié sur *B. cereus*. Ce composé pénètre dans la bicouche lipidique et se positionne entre les chaînes d'acides gras. Cette déformation de la structure augmente la fluidité membranaire, aboutissant à une modification de la perméabilité passive. Chez les bactéries exposées au carvacrol, on observe une diminution de l'ATP intracellulaire, mais aussi une diminution du potentiel membranaire. Ainsi, le carvacrol, en augmentant la perméabilité de la membrane plasmique, n'entraîne pas une fuite d'ATP mais une fuite de protons, qui provoque la chute de la force protomotrice et, donc, de la synthèse d'ATP. Cette information est confirmée par la mesure du gradient de pH à travers la membrane plasmique. Le carvacrol formerait des canaux dans la membrane permettant la fuite des ions (Ultee *et al.*, 2002). En plus de limiter la croissance, le carvacrol est capable d'inhiber la production de toxines chez *B. cereus*. (Ultee et Smid, 2001).

L'action du thymol a été étudiée sur des membranes artificielles (Trombetta *et al.*, 2005). Son efficacité dépend de la composition et de la charge nette de la membrane. Lorsqu'il pénètre dans la membrane plasmique, il semble altérer sa perméabilité et entraîner une perte du matériel intracellulaire. De plus, après avoir traversé la membrane, il peut interagir avec des sites intracellulaires (Rasooli *et al.*, 2006).

L'effet des huiles essentielles de *Thymus vulgaris* et de *Thymus satureioides* dans la diminution de la charge bactérienne initiale de la viande hachée a été montré par Danoune et Dziri (2008). Aussi, l'effet antibactérien des huiles essentielles d'Eucalyptus, Myrte et Sarriette sur la viande fraîche type hachée a été mis en évidence par Bourit et Boussad (2008). Les huiles

essentielles de Sarriette des montagnes et de laurier noble ont considérablement réduit la charge bactérienne de la viande de dinde de commerce (Mansour *et al.*, 2009).

Par ailleurs, les deux souches se sont avérées sensibles, à l'acide citrique dosé à 10%, à 8% et à 6% ; mais résistantes aux échantillons dosés à 4% (diamètres inférieur à 8mm) et à 3%.

Ces résultats sont semblables à ceux publiés par Bjornsdottir *et al.* (2006), Gomes *et al.* (2013) et Kim *et al.* (2013).

De même, Séon et Simões Nunes (2009) ont étudié l'effet de plusieurs acides organiques y compris l'acide citrique sur une autre bactérie pathogène *Salmonella* et ont rapportés des résultats proches des nôtres.

Selon Cherrington *et al.* (1991), les mécanismes d'action des acides organiques sont divers. Il faut ajouter à l'effet acidifiant, l'activité antimicrobienne spécifique de l'acide utilisé.

D'une manière général, les acides organiques agissent en trois étapes : d'abord, certaines molécules se dissocient ce qui engendre l'acidification du milieu (Gouget, 2013). Ensuite, ces molécules d'acides dissociées, ne pouvant pas pénétrer dans la membrane plasmique, endommagent la structure des protéines membranaires. Ainsi, sa perméabilité aux minéraux comme le sodium ou le potassium s'en trouve modifiée d'où découle la modification de la pression osmotique qui entraîne la mort de la cellule (Papagianni, 2007). Enfin, les molécules d'acide non dissociées, lipophiles, pénètrent à l'intérieur des cellules cibles par diffusion passive à travers la membrane plasmique. Une fois dans le cytoplasme, l'acide se dissocie et libère des protons ( $H^+$ ) qui se liaient à d'autres molécules comme les acides aminés. Ainsi, l'activité de certains systèmes enzymatiques, dont ceux nécessaires pour la multiplication de l'ADN se verra inhibée. Le microorganisme ne peut, donc, plus se multiplier (Chene, 2002 ; Servin, 2004).

En ce qui concerne le chitosane, les deux souches bactériennes étaient sensibles à l'effet de l'échantillon de : chito2.3.

Les échantillons de : chito2.0 et chito3.0 ont montré une activité moins prononcée. Par contre, l'échantillon de : chito1.3 n'a exercé aucune activité.

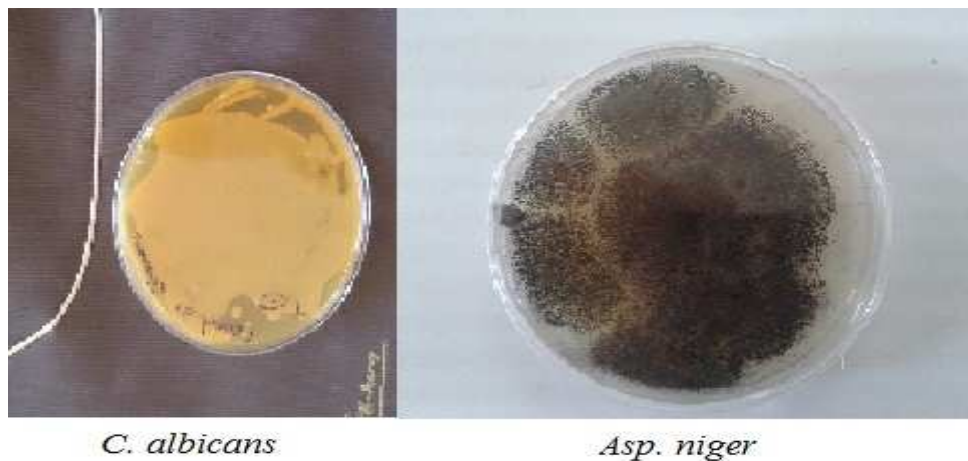
Les résultats que nous avons obtenus correspondent à ceux publiés par Rabea *et al.* (2003) et Sogias *et al.* (2010).

Selon Rabea *et al.* (2003), l'action antimicrobienne du chitosane est à la fois antifongique, antibactérienne et algicique, elle est produite de différentes manières. Il a d'abord un effet inhibiteur sur certaines enzymes. Par ailleurs, son caractère chélatant le conduit à emprisonner des cations métalliques ce qui limite la production de toxines et la

croissance des micro-organismes. Enfin, les groupements ammonium quaternaires du chitosane ont des effets bactériostatiques et bactéricides (Bordenave *et al.*, 2010).

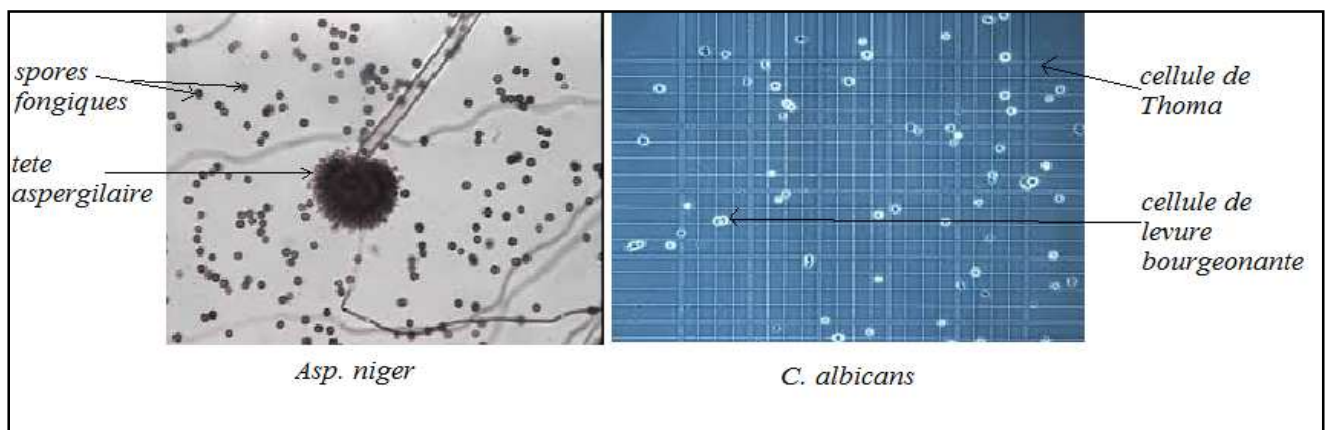
### I.3. Activité antifongique

Avant d'effectuer le test de l'activité antifongique, un examen macroscopique et microscopique des souches fongiques utilisées a été réalisé. L'aspect macroscopique est illustré par les photos rapportées dans la Figure 15.



**Figure 15:** Photos illustrant l'aspect macroscopique (colonies) des souches fongiques.

L'examen microscopique du mycélium fongique et de la suspension de la levure au G×400 a permis d'avoir les illustrations (photos) présentées dans la figure 16.

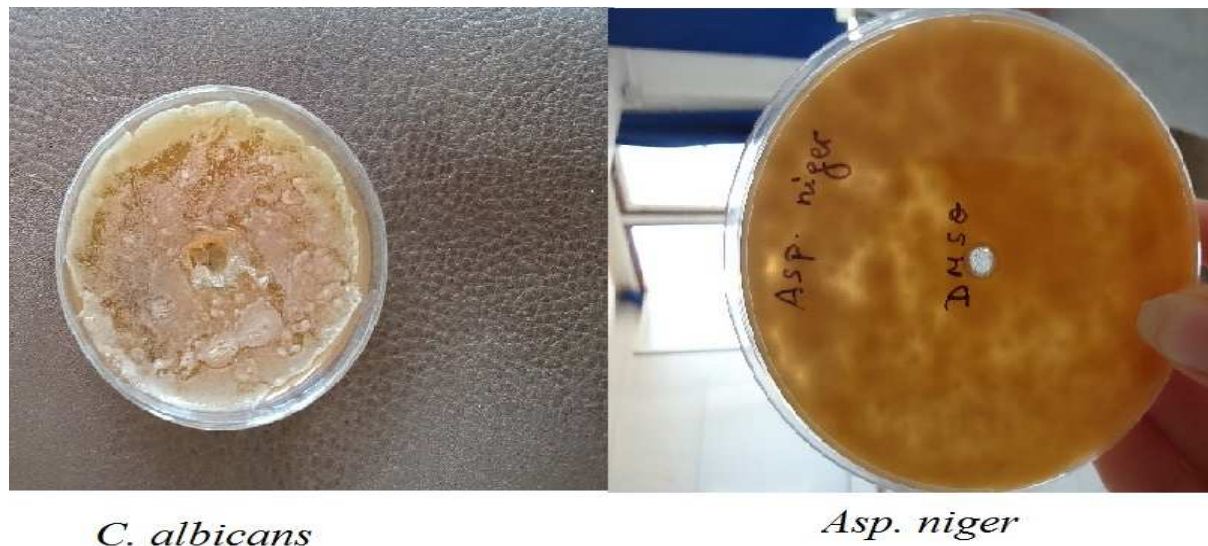


**Figure 16:** Photos observées au G×400 montrant l'aspect microscopique des souches fongiques testées.

Les observations faites ont permis de confirmer les souches fongiques à tester.

## I.3.2. Résultats du témoin négatif

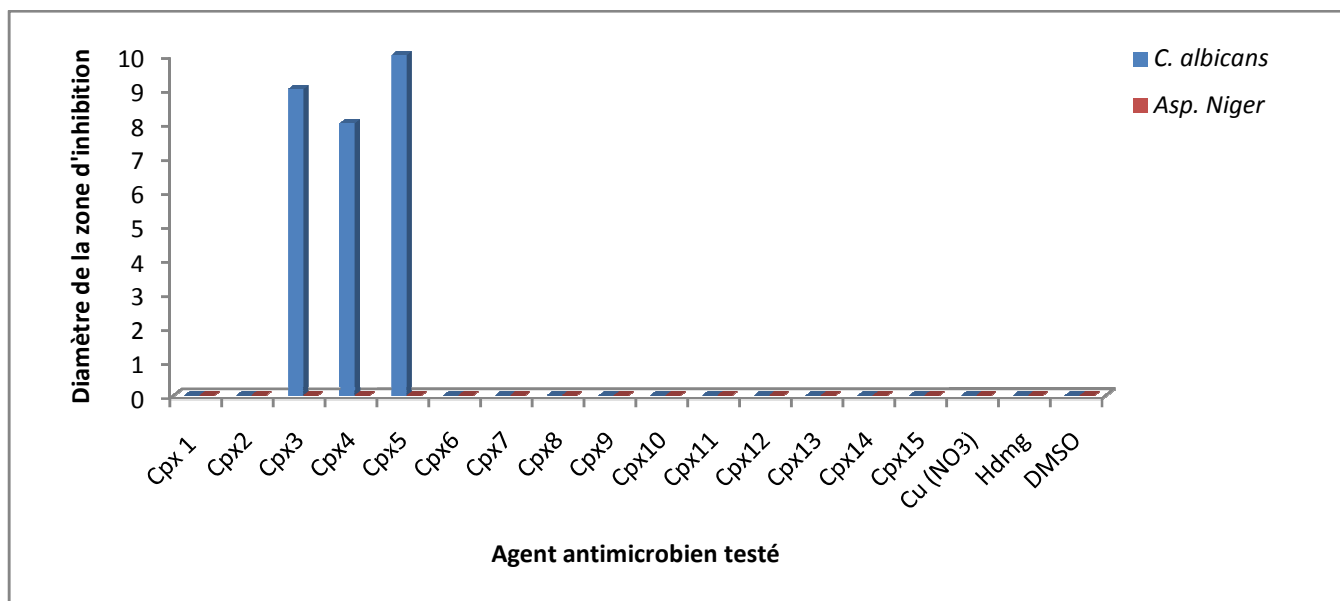
Le DMSO a été testé comme solvant. Les résultats montrent qu'il est approprié et ne présente aucun effet sur la croissance normale des souches fongiques (figure 17).



**Figure 17:** Effet du témoin négatif (DMSO) sur les souches fongiques.

## I.3.3. Activité antifongique des complexes chimiques

Les résultats du test de l'activité antifongique des complexes chimiques sont présentés dans la Figure 18.



**Figure 18:** Les résultats du criblage des complexes chimiques sur les souches fongiques.

D'après l'histogramme (Figure 18), la moisissure : *Asp. niger*, semble résistante aux différents complexes chimiques ainsi qu'aux ligands. Ceci s'est traduit par le développement du champignon sur toute la surface de la gélose (absence de zones d'inhibition).

Ceci peut être expliqué par la résistance connue de ce champignon. Ces résultats sont en accord avec ceux de Chevy (2011).

La difficulté de développer une molécule antifongique est liée, d'une part à l'ultrastructure de la cellule fongique qui présente trois barrières : la paroi cellulaire chitineuse, les ergostérols membranaires et le noyau eucaryote et d'autre part, les molécules antifongiques elles-mêmes qui peuvent engendrer des résistances (Prasad et Kapoor, 2004).

Toutefois, Arun et Raman (2014) ont démontré que des complexes métalliques à base de cuivre avaient un effet fongicide. Cette différence de résultats peut être liée à la nature des complexes testés et aux méthodes utilisées.

Quant à la levure *C. albicans*, elle s'est avérée résistante aux ligands et à la plupart des complexes chimiques testés.

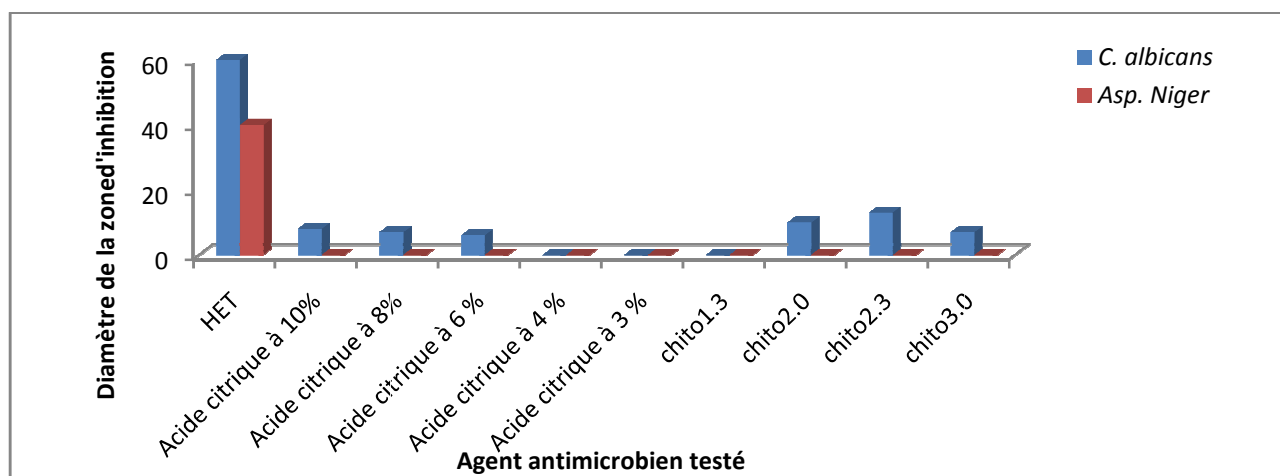
Toutefois, trois complexes : Cpx3, Cpx4 et Cpx5 se sont montrés actifs sur la levure en produisant des zones d'inhibition de diamètres de 9mm, 8mm et 10mm respectivement.

Ces résultats s'approchent de ceux publiés par Chevy (2011) et Raman *et al.*, (2014).

### I.3.4. Activité antifongique de l'HET, de l'acide citrique et du chitosane

Nous avons évalué l'activité antifongique de l'huile essentielle de thym pure, des cinq dilutions de l'acide citrique et des quatre échantillons du chitosane par la méthode des puits.

Les résultats de ce test sont représentés dans la Figure 19.



**Figure 19:** Effet antifongique de l'HET, de l'acide citrique et du chitosane sur les souches fongiques.

Les résultats obtenus montrent, d'une part, que *C. albicans* s'est avérée sensible à deux échantillons du chitosane : chito2.0 et chito2.3 avec des diamètres de 10mm et 13mm respectivement ; et extrêmement sensible à l'HET avec un diamètre de 60mm. Cependant, cette même levure est résistante aux deux autres échantillons du chitosane ainsi qu'aux différentes dilutions de l'acide citrique (diamètres  $\leq 8$ mm).

Et d'autre part, *Asp. niger* est résistant aux cinq dilutions de l'acide citrique. Ceci peut être lié à la production de ce même acide par cette moisissure. En effet, les souches productrices développent une résistance à l'encontre des substances antimicrobiennes qu'elles produisent (Prasad et Kapoor 2004).

Par contre, le champignon s'est avéré extrêmement sensible à l'HET avec un diamètre de 40mm (Figure 20).



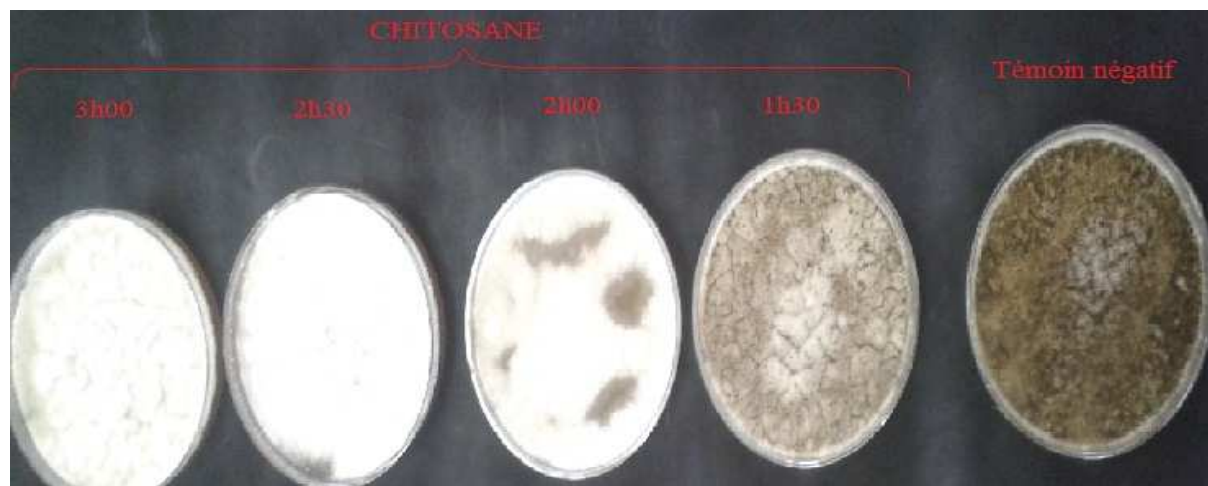
**Figure 20:** Photo illustrant l'effet de l'HET sur *Asp. niger* après 72h d'incubation.

L'efficacité de l'HET est liée à un certain nombre de ses composants fonctionnant en synergie (Derwich *et al.*, 2010). L'activité antifongique de cette huile est due à la présence de carvacrol en concentration relativement élevée (Ultee *et al.*, 2002). Un autre composé « le thymol » possède, lui aussi, une large gamme d'activité antibactérienne et antifongique (Imelouane *et al.*, 2009).

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

Rasooli *et al.* (2006) ont déjà étudié les effets antifongiques de l'H.E.T et plus particulièrement sur les conséquences de cette huile sur l'ultrastructure du champignon *Asp. niger*. Ils ont démontré grâce à la microscopie électronique, que lorsqu'*Asp. niger* était exposé à l'H.E.T., celle-ci provoquait des dommages irréversibles sur la membrane cellulaire ainsi que sur les organites du champignon, alors qu'elles inhibent la germination des spores, l'élongation du mycélium, la sporulation et la production de toxines chez d'autres moisissures.

Par contre, le chitosane semble exercer un effet de retardement de la croissance de la moisissure : après 72h d'incubation les boîtes contenant le chito2.0, chito2.3 et chito3.0 étaient encore au stade de la formation du mycélium alors que le témoin négatif (moisissure cultivée seule) et la boîte contenant chito1.3 était au stade de sporulation (Figure 21).



**Figure 21:** Effet du chitosane sur la croissance d'*Asp. niger*.

Nos résultats concordent avec ceux publiés par Taillandier *et al.* (2014). Par contre, Rabea *et al.*, 2003 ont démontré un effet fongicide du chitosane sur *Asp. niger* et *Botrytis cinerea*. Selon ces derniers auteurs, l'activité antifongique du chitosane peut être expliquée par son effet inhibiteur sur certaines enzymes. Par ailleurs, son caractère chélatant le conduit à emprisonner des cations métalliques ce qui limite la croissance des micro-organismes.

## II. Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI)

La détermination des CMI des différents agents antimicrobiens testés dans cette étude a été réalisée avec la méthode des spots où une dilution volume à volume (des volumes variables de l'agent à tester sont incorporés 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 et fongiques sont rapportés dans le Tableau IX.

**Tableau IX:** CMI des souches bactériennes et fongiques exprimées en pourcentage.

		<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>Asp. Niger</i>
<b>H.E.T</b>		0,66%	0,33%	0,33%	0,33%
<b>Acide citrique</b>		8,33%	3,33%	23,33%	-
<b>Chitosane</b>		33,33%	26,66 %	66,66 %	-
<b>Complexes chimiques</b>	<b>n° 3</b>	50%	-	-	-
	<b>n° 5</b>	-	-	26,66 %	-
	<b>n° 12</b>	-	33,33%	-	-

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

La plus faible CMI a été obtenue avec l'HET vis-à-vis des souches fongiques et de *B. cereus*, soit 0,33%. Tandis que la CMI la plus élevée a été enregistrée avec le chitosane vis-à-vis de *C. albicans*, soit 66,66%.

Les CMI de l'HET ont été déterminées à des valeurs très basses (0,66% vis-à-vis d'*E. coli*, à 0,33% vis-à-vis de *B. cereus*, *C. albicans* et *Asp. niger*). Ce qui s'explique par la quantité infime de l'huile incorporée dans le milieu (20µl et 10µl respectivement).

Nous pouvons déduire que l'HET a une activité très importante d'autant plus qu'elle est efficace sur les quatre souches testées.

Toutefois, nos résultats sont inférieurs à ceux obtenus par plusieurs auteurs (Falleh *et al.*, 2008 ; Hayouni *et al.*, 2007 ; Kone *et al.*, 2004).

Par contre, des études récentes (Amrouche *et al.*, 2015 ; Burt, 2007 ; Friedman *et al.*, 2002 ; Mayaud *et al.*, 2008) ont obtenus des résultats qui s'approchent des nôtres.

Les CMI des complexes chimiques et celles du chitosane sont relativement élevées par rapport à celles des autres agents testés.

Les CMI de l'acide citrique sont basses vis-à-vis des souches bactériennes et moyennes vis-à-vis de la levure.

### III. Détermination des Concentrations Minimales Bactéricides (CMB) et fongicides (CMF)

La détermination des CMB et des CMF a été effectuée avec la méthode des spots. Les résultats sont exprimés en pourcentage, ils sont indiqués dans le Tableau X.

**Tableau X :** Valeurs (%) des CMB et des CMF

		<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>Asp. niger</i>
<b>H.E.T</b>		1 %	0,33%	0,66%	0,66%
<b>Acide citrique</b>		13,33 %	8,33%	33,33%	-
<b>Chitosane</b>		33,33 %	26,66 %	66,66%	-
<b>Complexes chimiques</b>	<b>n° 3</b>	50%	-	-	-
	<b>n° 5</b>	-	-	33,33%	-
	<b>n°12</b>	-	40%	-	-

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

D'après les résultats obtenus, l'HET exerce un effet bactéricide et fongicide vis-à-vis de l'ensemble des souches testées.

Aussi, l'acide citrique et le chitosane exercent un effet bactéricide vis-à-vis des deux bactéries étudiées et un effet fongicide vis-à-vis de *C. albicans*.

Et enfin, les complexes chimiques exercent un effet bactéricide et fongicide vis-à-vis des souches sur lesquelles ils sont testés.

#### IV. Effet des combinaisons des substances étudiées

Dans le but d'optimiser l'action antimicrobienne des différents agents testés et de diminuer leurs CMI (estimer leurs concentrations sub-inhibitrices), nous avons combiné deux à deux ceux présentant un effet antibactérien et/ou antifongique. Les mélanges obtenus sont testés par la méthode des puits sur les souches choisies pour cette étude.

##### IV.1. Association de l'HET et les complexes chimiques

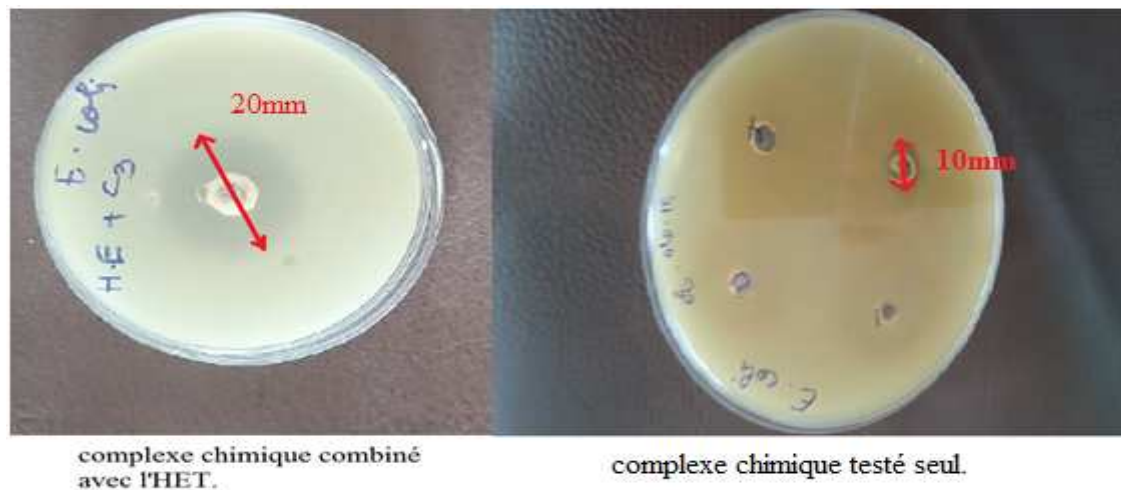
Nous avons mélangé 50% de l'HET pure et 50% du complexe chimique doté d'une activité antimicrobienne, pour un volume final de 50 µl. Ensuite, nous avons testé l'activité du mélange par la méthode des puits sur les souches bactériennes et fongiques.

Les résultats de ce test sont résumés dans le Tableau XI.

**Tableau XI :** Résultats de la combinaison des complexes chimiques avec l'H.E.T

<b>Combinaison</b>	<b>Souche microbienne testée</b>	<b>Diamètres de la zone d'inhibition (mm)</b>
<b>H.E.T + complexes n° 3</b>	<i>E. coli</i>	20
<b>H.E.T + complexes n° 5</b>	<i>B. cereus</i>	19
<b>H.E.T + complexes n° 12</b>	<i>C. albicans</i>	60

Ces résultats montrent que, malgré une faible activité antibactérienne lorsqu'ils sont employés seuls, l'activité des complexes chimiques est grandement améliorée en présence de l'HET. Les photos montrant ces effets sont illustrées dans la Figure 22.



**Figure 22:** Photos comparant l'effet des complexes employés seuls et combinés avec l'HET.

Le mode d'action des combinaisons diffère de façon significative de celui des mêmes agents agissant individuellement. Hemaiswarya *et al.* (2008), suppose que l'un des agents combinés affaiblit le microorganisme et l'autre agent l'achève.

Une autre hypothèse (Musiol, 2014) : lors des combinaisons il y'a formation de nouvelles molécules auxquelles les germes ne sont pas encore adaptés. Ceci règle, momentanément, le problème de résistance.

### IV.2. Association de l'acide citrique et des complexes chimiques

Nous avons effectué cinq dilutions de l'acide citrique : 10%, 8%, 6%, 4% et 3%. Puis, nous avons mélangé 50% de complexe chimique avec 50% de chacune des cinq dilutions pour un volume finale de 50  $\mu$ l. Ensuite, nous avons testé l'activité des mélanges obtenus sur les souches bactériennes et fongiques testées dans cette étude.

Les résultats de ce test sont rapportés dans le Tableau XII.

**Tableau XII :** Résultats de la combinaison des complexes chimiques avec l'acide citrique

Combinaison		Souche microbienne testée	Diamètres de la zone d'inhibition (mm)
Complexe n° 3 +	Ac. citrique à 10 %	<i>E. coli</i>	10
	Ac. citrique à 8 %	<i>E. coli</i>	09
	Ac. citrique à 6 %	<i>E. coli</i>	07
	Ac. citrique à 4 %	<i>E. coli</i>	06
	Ac. citrique à 3 %	<i>E. coli</i>	06
Complexe n° 5 +	Ac. citrique à 10 %	<i>C. albicans</i>	06
	Ac. citrique à 8 %	<i>C. albicans</i>	06
	Ac. citrique à 6 %	<i>C. albicans</i>	06
	Ac. citrique à 4 %	<i>C. albicans</i>	06
	Ac. citrique à 3 %	<i>C. albicans</i>	06
Complexe n° 12 +	Ac. citrique à 10 %	<i>B. cereus</i>	15
	Ac. citrique à 8 %	<i>B. cereus</i>	12
	Ac. citrique à 6 %	<i>B. cereus</i>	10
	Ac. citrique à 4 %	<i>B. cereus</i>	07
	Ac. citrique à 3 %	<i>B. cereus</i>	06

Ces résultats montrent que la combinaison du complexes n°12 avec l'acide citrique dosé à 10% et à 8%, testé sur *B. cereus*, augmente légèrement les diamètres des zones d'inhibition (15mm et 12mm respectivement) par rapport au diamètre du halo d'inhibition du complexe testé seul sur la même souche (10mm).

Par contre, nous avons observé l'effet inverse avec les autres combinaisons sur les trois souches testées. Nous supposons que ceci est dû au changement de la structure des complexes métalliques en milieu acide ce qui leur fait perdre leur activité antimicrobienne.

### IV.3. Association de l'HET et l'acide citrique

Nous avons effectué cinq dilutions successives par facteur de deux en ce qui concerne l'HET et cinq dilutions de l'acide citrique. Puis, nous avons réalisé des associations entre les différentes dilutions. Les différents mélanges ont été testés sur les souches choisies pour cette étude (nous avons utilisé les boîtes de Pétri de 60mm de diamètre).

Les résultats obtenus sont résumés dans les Tableaux XIII, XIV et XV.

**Tableau XIII** : Résultats de la combinaison de l'H.E.T avec l'acide citrique testé sur *E.coli*

Diamètres des zones d'inhibition (mm)					
H.E.T Ac. citrique	H.E.T pure ⊙ = 25	Dilution au 1/2 ⊙ = 20	Dilution au 1/4 ⊙ = 18	Dilution au 1/8 ⊙ = 18	Dilution au 1/16 ⊙ = 15
à 10 % ⊙ = 14	28	24	30	25	21
à 8 % ⊙ = 11	27	26	25	24	18
à 6 % ⊙ = 10	27	24	24	22	16
à 4 % ⊙ = 07	25	19	18	16,5	15
à 3 % ⊙ = 06	17	15	15	13	10

⊙ : Diamètre.

**Tableau XIV :** Résultats de la combinaison de l'H.E.T avec l'acide citrique testé sur *B.cereus*

<b>Diamètres des zones d'inhibition (mm)</b>					
H.E.T Ac. citrique	H.E.T pure ⊙ = 30	Dilution au 1/2 ⊙ = 28	Dilution au 1/4 ⊙ = 26	Dilution au 1/8 ⊙ = 20	Dilution au 1/16 ⊙ = 15
<b>à 10 % ⊙ = 16</b>	60 (inhibition totale)	60 (inhibition totale)	60 (inhibition totale)	28	18
<b>à 8 % ⊙ = 13</b>	60 (inhibition totale)	60 (inhibition totale)	26	20	16
<b>à 6 % ⊙ = 12</b>	60 (inhibition totale)	60 (inhibition totale)	26	20	15
<b>à 4 % ⊙ = 07</b>	60 (inhibition totale)	60 (inhibition totale)	26	20	15
<b>à 3 % ⊙ = 06</b>	23	22	17	15	10

⊙ : Diamètre.

**Tableau XV :** Résultats de la combinaison de l'H.E.T avec l'acide testé sur *C. albicans*

<b>Diamètres des zones d'inhibition (mm)</b>					
H.E.T Ac. citrique	H.E.T pure ⊙ = 60	Dilution au 1/2 ⊙ = 30	Dilution au 1/4 ⊙ = 25	Dilution au 1/8 ⊙ = 20	Dilution au 1/16 ⊙ = 13,5
<b>à 10 % ⊙ = 08</b>	60 (inhibition totale)	60 (inhibition totale)	38	35	30
<b>à 8 % ⊙ = 07</b>	60 (inhibition totale)	60 (inhibition totale)	36	29	26
<b>à 6 % ⊙ = 06</b>	60 (inhibition totale)	60 (inhibition totale)	36	26	24
<b>à 4 % ⊙ = 06</b>	30	32	26	23	15
<b>à 3 % ⊙ = 06</b>	28	26	20	18	13,5

Les résultats obtenus montrent que la combinaison de l'HET avec l'acide citrique optimise l'activité antimicrobienne de ce dernier.

Nous remarquons qu'entre les concentrations 10% et 4% de l'acide citrique l'activité du mélange est intense. Les diamètres des halos d'inhibition sont supérieurs à ceux obtenus en employant les agents séparément. Les concentrations de l'HET sont diminuées de 25 % grâce à la combinaison puisque avec la dilution au ¼ nous avons obtenu des diamètres égaux à ceux que nous avons eu en utilisant l'huile pure toute seule. De même, les concentrations de l'acide diminuent de plus de 50 %, ceci traduit probablement un effet additionnel.

Lorsque la concentration de l'acide est inférieure à 4%, les diamètres sont inférieurs ou égaux à ceux que nous avons obtenus en employant l'HET seul. L'effet, dans ce cas, semble être antagoniste.

Toutefois, dans certaines combinaisons, le diamètre dépasse largement la somme des diamètres des zones d'inhibition obtenues avec chacun des agents testé seul (exemple : dilution au ½ de l'HET + l'acide citrique à 10% testé sur *C. albicans*). Dans ces cas, nous pouvons parler de synergie.

Selon Rasooli (2007), en règle générale, la sensibilité des microorganismes à l'effet inhibiteur des HE semble augmenter avec une diminution du pH de l'aliment, la température de stockage et la quantité d'oxygène dans l'emballage. À pH faible, l'hydrophobicité de l'HE augmente ce qui lui permet de se dissoudre plus facilement dans les lipides de la membrane cellulaire des bactéries cibles. Ceci coïncide partiellement avec nos résultats.

Michiel *et al.* (2007) affirme qu'à pH bas, les molécules de thymol et carvacrol, qui constituent les composés majeurs de l'HET, sont sous forme indissociée et hydrophobe ce qui peut conduire à une meilleure association avec les domaines hydrophobes des protéines, donc une bonne accumulation dans la phase lipidique de la membrane des cellules qui est le siège de beaucoup d'interactions métaboliques.

# *Conclusion et Perspectives*

# Conclusion et Perspectives

---

La recherche de nouvelles substances naturelles susceptibles d'être utilisées comme agents de conservation naturels (bio-conservateurs), revêt actuellement un intérêt grandissant.

La présente étude vise à évaluer de façon comparative l'activité antibactérienne et antifongique de l'HET, du chitosane, de l'acide citrique et des complexes métallique à base de cuivre. Puis, réaliser des combinaisons entre les substances dotées d'une activité antimicrobienne.

Nos résultats permettent de conclure que les souches bactériennes *Escherichia coli* et *Bacillus cereus*, ainsi que la levure *C. albicans* sont extrêmement sensibles à l'HET, moyennement sensibles à l'encontre du chitosane et de l'acide citrique, mais ont montré une sensibilité moyenne à modérée à l'encontre de certains complexes chimiques. Quant à *Asp. niger*, il était classé comme extrêmement sensible (selon la classification de Ponce, 2003) vis-à-vis de l'HET. Le chitosane semble retarder la croissance de cette moisissure. Toutefois, les autres substances testées se sont avérées inactives vis-à-vis du champignon.

En outre, la combinaison de l'HET avec l'acide citrique testé sur *E. coli*, *B. cereus* et *C. albicans*, a montré un effet additionnel. En effet, l'association a permis la réduction des concentrations de l'huile et de l'acide de 25% et de plus de 50% respectivement.

Nos résultats restent préliminaires et méritent une étude plus approfondie en considérant les aspects suivant :

- ☞ Tester ces combinaisons sur d'autres souches pathogènes impliquées dans la détérioration des aliments et les intoxications alimentaires.
- ☞ Essayer *in vitro* d'autres combinaisons, par exemple : associer l'HET avec, entre autres, les bactériocines, le chitosane et les métaux de transition telle que le cobalt, le cuivre et le nickel.
- ☞ Tester ces combinaisons sur des matrices alimentaires.
- ☞ Elucider les mécanismes moléculaires des combinaisons et leur spectre d'activité.
- ☞ Etudier la toxicité des agents antimicrobiens combinés.
- ☞ 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. Ceci aiderait à minimiser les doses de l'acide citrique dans les aliments et ainsi, améliorer leurs saveurs.
- ☞ Utiliser ces combinaisons dans le domaine pharmaceutique et cosmétique.

# *Références Bibliographiques*

## Références Bibliographiques

---

### A

- **AGULLÓ E., RODRIGUEZ M. S., RAMOS V., and ALBERTENGO L. (2003).** Present and future role of chitin and chitosan in food. *Macromol. Biosci.* Vol.3, (10), 521-530. *Antimicrobials in foods*, 2nd Ed. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y. pp. 441-468.
- **AMROUCHE T., DJENANE D., DZIRI F., DANOUN K., DJERBA M., and RONCALES RABINAL P. (2015).** Inhibition of pathogenic bacteria in minced meat using plant essential oils. (Soumis Canadian journal of microbiology)
- **APROTOSOAIE A.C., SPAC A.D., HANCIANU M., MIRON A., TANASESCU V.F., DORNEANU V., STANESCU U. (2010).** The chemical profile of essential oils obtained from fennel fruits (*Foeniculum vulgare* Mill.). *FARMACIA*, 58 (1). pp. 46-54
- **AROUS S., DALET K., and HECHARD Y. (2004).** Involvement of the mpo operon in resistance to class IIa bacteriocins in *L. monocytogenes*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **238**, 37-41.
- **ARUN T.R., and RAMAN N. (2014).** Antimicrobial efficacy of phenanthrenequinone based Schiff base complexes incorporating methionine amino acid: structural elucidation and in vitro bio assay. *Elsevier B.V.2014*.
- **ARUOMA O., SPENCER J., BUTLER J., and HALLIWELL B. (1995).** Commentary reaction of plant-derived and synthetic antioxidant with trichloromethylperoxyl radicals. *Free Rad Res*, **22**, 187-190.

### B

- **BAHORUN T. (1997).** Substances Naturelles Actives : La Flore Mauricienne, Une Source D'approvisionnement Potentielle. *Food and Agricultural Research council*.
- **BAHURON T., GRESSIER B., TROTIN F., BRUNET C., DINE T., LUYCKY M., VASSEUR J., CAZIN M., CAZIN J.C. and PINKAS M. (1996).** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittelforschung/ Drug Research*, **46 (11)**, 1086-1089.
- **BARD A., and FAULKNER L.R. (1983).** Electrochimie, Principes, Méthodes et Applications Ed. Masson Paris.
- **BARTLETT P. A., MARLOWE C. K., GIANNOUSIS P. E., HANSON J. E. (2010).** Organic Chemistry Cell Molecules. *Life Sci.*, **61**, (2010).
- **BATATWITA K., KOKON K., AKPAGONA K., KOUMAGLO K., , and BOUCHET P. (2002).** Activité antifongique d'une espèce en voie de disparition de la flore togolaise : *Conyza aegypticae*. Cité par Akroum S. (2006). Mémoire de magister, université de Constantine, 58.
- **BAUER R., and DICKS L.M.T. (2005).** Mode of action of lipid II-targeting lantibiotics. *Int. J. Food Microbiol.*, **101**, 201-216.
- **BEKHECHI C., and ABDELOUAHAB D. (2010).** Les huiles essentielles. Office des publications universitaires .Ed : P/n° 5145.ISBN :978 .9961.0.1394.6.

## Références Bibliographiques

---

- **BELGUESMIA, Y., NAGHMOUCHI, K., CHIHIB, N.-E., and DRIDER, D. (2011).** Class IIa bacteriocins: current knowledge and perspectives. In: Drider, D., and Rebuffat, S. (Eds). *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*. Springer Verlag. Nantes, France. pp 1-41.
- **BENESCH J. (2001).** Null Ellipsometry and protein adsorption to model biomaterials.
- **BENNETT R.J. and JOHNSON A.D. (2003).** Completion of a parasexual cycle in *Candida albicans* by induced chromosome loss in tetraploid strains. *Embo J.* 22: 2505-2515.
- **BENNETT R.J., and JOHNSON A.D. (2005).** Mating in *Candida albicans* and the search for a sexual cycle. *Annu rev Microbiol.*, n° 59, p. 233-255.
- **BIDET D., GAIGNAULT J.C., GIRARD P. et TROTIN F. (1987).** Inflammation, allergie, douleur et acide arachidonique : du jardin des Hespérides à la cascade de l'acide arachidonique : les flavonoïdes. *L'actualité chimique*, 89-97.
- **BJORNSDOTTIR K, BREIDT F, JR., MCFEETERS RF (2006).** Protective effects of organic acids on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in acidic environments. *Appl. Environ. Microbiol. Jan. 2006 ; 72(1) ; pp:660-664.*
- **BLAIR G. and STAAL P. (1993).** CITRIC ACID. In *KIRK-OTTMER ENCYCLOPEDIA OF CHEMICAL TECHNOLOGY*, 4E ÉD. VOL. 6, P. 354-380, WILEY, NEW YORK (USA).
- **BLUMBERG P. M., STROMINGER J.L (1974).** Interaction of penicillin with the bacteria cell: penicillin binding proteins and penicillin sensitive enzymes. *Bacteriol. Rev.* 38: 291.
- **BOONAERT C.J.P. and ROUXHET P.G. (2000).** Surface of bacteria. Relationships between chemical composition and physicochemical properties. *Applied Environmental Microbiology*, 66, 2548-2554.
- **BORDENAVE N., GRELIER S., and COMA V. (2010).** Hydrophobization and antimicrobial activity of chitosan and paper-based packaging material. *Biomacromolecules*, vol. 11, n°1, p. 88-96.
- **BOTTON B., BRETON A., FEVRE M., GAUTHIER S., GUY P., LARPENT J.P., REYMOND P., SANGLIER J.J., VAYSSIER Y. et VEAU P. (1999).** Moisissures utiles et nuisibles : importance industrielle. *Edition Masson*, Paris. France.
- **BOURIT and BOUSSAD N. (2008).** Détermination « *in vivo* » du pouvoir antibactérien des huiles essentielles d'Eucalyptus, Myrte, Clous de girofle, et Sarriette et leur application à la conservation des la viande fraîche type hachée. Thèse d'ingénieur. Université Mouloud Mammeri. Tizi Ouzou.96.
- **BROWNLEE H.E., HEDGER J. and SCOTT I.M. (1992).** Effects of a range of procyanidins on the cocoa pathogen *Crinipallis perniciosa*. *Phys. Mol. Plant Pathol*, 40, 227-232.
- **BRUNETON J. (1999).** Pharmacognosie: Phytochimie, Plantes médicinales. 2<sup>ème</sup> Ed. Lavoisier Techniques & Documentation, Paris. 915p.

## Références Bibliographiques

---

- **BURT S. (2004).** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods, a review. *Int. J. Food Microbiol.* **94**: 223-253.
- **BURT S. (2007).** Antibacterial activity of essential oils: potential applications in food [PhD thesis]. *Utrecht: Utrecht University; 2007.*



- **CAHAGNIER B., and RICHARD M.D. (1998).** Analyse mycologique in Moisissures des aliments peu hydratés. *Tec. et Doc*, 140-158.
- **CALEB NOBLE CHANDAR S., SANGEETHA D. and ARUMUGHAM M.N. (2011).** Synthesis, structure, CMC values, thermodynamics of micellization, steady-state photolysis and biological activities of hexadecylamine cobalt (III) diméthyl glyoximato complexes. *Transition Met. Chem.* (2011) Vol: **36**, pp: 211-216 Doi: 10.1007/s 11243-010-9456-9.
- **CARSON C.F., MEE B.J., and RILEY T.V. (2002).** Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined par time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 1914-1920.
- **CASTELLANO P. (2007).** Molecular view by fourier transform infrared spectroscopy of the relationship between lactocin 705 and membranes: speculations on antimicrobial mechanism. *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**(2), 415-420.
- **CCLIN. (2000).** Antiseptiques et désinfectants. *Centre de Coordination de la Lutte contre les Infections Nosocomiales*. Banque de Données Automatisée sur les Médicaments. Paris-Nord.
- **CENATIEMPO Y., BERJEAUD J.-M., BIET F., FREMAUX C., HECHARD Y. and ROBICHON D. (1996).** Bactériocines de bactéries lactiques: données récentes sur leur structure, leur mode d'action et leurs déterminants génétiques. *Le lait.* **76**, 169-177.
- **CHANG WEN- TEISH, YU- CHUNG CHEN AND CHIA-LING JAO. (2006).** Antifungal activity and enhancement of plant growth by *Bacillus cereus* grown on shellfish chitin wastes. *Bioures. Technol.* Vol.98, (6), 1224-1230. characterization and identification of acidocin LCHV, an antimicrobial peptide produced by *Lactobacillus acidophilus* n.v. Er 317/402 strain narine. *Int.J. Antimicrobial Agents.* **35**: 255-260.
- **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. *C.E.A.I. 62217 Tilloy les Mofflaines ADRIANOR.*
- **CHERRINGTON C. A., HINTON M., MEAD G. C. and CHOPRA I. (1991).** Organic acids: chemistry, antibacterial activity and practical applications. *Adv. Microb. Physiol.*, **32**, pp. 87-108.
- **CHEVRY A. (2011).** Complexes click de platine et cuivre-NHC : applications en biologie. *Other. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2011. France.*

## Références Bibliographiques

---

- **CHOI H-S., SONG H.S., UKEDA H., and SAWAMURA M. (2000).** Radical-Scavenging Activities of Citrus Essential Oils and Their Components: Detection Using 1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl. *J. Agric.*
- **CMR (2004).** Chemical Marketing Reporter, VOL. **249**, N° **26**, SCHNELL PUBLISHING COMPANY INC., NEW YORK (USA). (2004).
- **CODEX (2009).** Chitosane. *CODEX OENOLOGIQUE INTERNATIONAL COEI-1-CHITOS : 2009*.
- **CONNER D. E. (1993).** Naturally occurring compounds. In Davidson P. M.; Branen A. L.
- **COTTER P. D., HILL C., and ROSS R. P. (2005)** Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol.*3: 777-788.
- **COWAN M.M. (1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12 (4), 564-582.
- **COX S.D., MANN C.M. and MARKHAM J.L. (2001).** Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J. Appl. Microbiol.* **2001**, 91, 492–497.
- **COX S.D., MANN C.M., MARKHAM J.L., BELL H.C., GUSTAFSON J.E., WARMINGTON J.R. and WYLLIE S.G. (2000).** The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J. Appl. Microbiol.* **88**: 170-175.
- **CRINI G., BADOT P.M. and GUIBAL E. (2009).** Chitine et chitosane : du biopolymère à l'application. Presses Universitaires de Franche-Comté, 2009.



- **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. and DZIRI F. (2008).** Etude de l'effet des huiles essentielles de Mente et Thym et de leurs interactions sur certaines bactéries pathogènes de la viande. *Thèse d'ingénieur .Université Mouloud Mammeri.*
- **DAS H.C., WANG J.H. and LIEN E.J. (1994).** Carcinogenicity and cancer preventing activities of flavonoids: A structure-system-activity relationship (SSAR) analysis. Jucker Ed, 133-136.
- **DAVID R. (2009).** *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, CRC Press Inc, 2009, 90° éd., Relié, 2804 p.
- **DE OLIVERA M.M., SAMPAIO M.R.P., SIMON F., GIBERT B. and MORS W.B. (1972).** Antitumor activity of condensed flavenols. *An. Acad. Brazil*, **44**, 41-44.
- **DEGRYSE A. C., DELFA I ,and VOINIER M.A. (2008).** Risques et bénéfices possible des huiles essentielles. *Ecole des Hautes Etudes en santé publique.*94, 8-11.

## Références Bibliographiques

---

- **DELAQUIS P, STANICH K, GIRARD B, MAZZA G (2002)** Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *Int. J. Food Microbiol.* **74**: 101-109.
- **DELARRAS C. (2007)**. Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. *Techniques et Documentation*, Lavoisier, Paris.
- **DEMBÉLÉ T., OBRZALEK V., VOTAVA M. (1998)**. Inhibition of bacterial pathogens by Lactobacilli. *Zent. Bl. Bacteriol.* , **288**: 395-401.
- **DHILLON G. S. (2011)**. "Recent Advances in Citric Acid Bio-production and Recovery." *Food and Bioprocess Technology* **4**(4): 505-529.
- **DIDRY N., PINKAS M. and TRORCK M. (1982)**. Sur la composition chimique et l'activité antibactérienne des feuilles de diverses espèces de grindelia. *Pl. Med. Phytother.* **XVI**, 7-15.
- **DIEP D., SALEHIAN Z., HOLO H. and NES I.F. (2007)**. Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocin. *Proc. Natl Acad. Sci.*, **104**, 2384-2389.
- **DIMARQ J.L., and HOFFMAN (2001)**. Peptides antimicrobiens : les antibiotiques du futur, *biofutur*.
- **DIMITRIJEVIC S.I., MIHAJLOVSKI K.R., ANTONOVIC D.G., MILANOVIC-STEVANOVIC M.R. and MIJIN D.Z. (2007)**. A study of the synergistic antilisterial effects of a sub-lethal dose of lactic acid and essential oils from *Thymus vulgaris L.*, *Rosmarinus officinalis L.* and *Origanum vulgare L.* *Food Chem.* **2007**,**104**, 774–782.
- **DORDEVIC S., PETROVIC S., DOBRIC S., MILENKOVIC M., VUCICEVIC D., ZIZIC S., KUKIC J. (2007)**. Antimicrobial, anti-inflammatory, anti-ulcer and antioxidant activities of *Carlina acanthifolia* root essential oil. *J. Ethnopharmacol.* **109**: 458-463.
- **DORTU C., and THONART P. (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.
- **DRIDER, D., FIMLAND, G., HÉCHARD, Y., MCMULLEN, L. M., PRÉVOST, H. (2006)**. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **2**: 564-582.



- **EFSA (2014)**. Chitosane. *PDR for Nutritional Supplements, Thomson Healthcare, EFSA, 2014. EU, Register on nutrition and health claims.*
- **EL- GHAOUTH A., ARUL J., ASSELIN A., BENHAMOU N. (1992)**. Antifungal activity of chitosan on two post- harvest pathogen of strawberry fruits. *Phytopath.* Vol.82, (4), 398-402.

## Références Bibliographiques

---

- **EL HAMIANI O., EL KHALIL H. , and BOULARBAH A. (2010).** Evaluation de la toxicité des polluants métalliques par l'utilisation d'un biotest microbiologique METPLATE™. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn. Vol 4, N°1, p : 69-81.*
- **ENNAHAR S., SASHIHARA T., SONOMOTO K. and ISHIZAKI A. (2000).** Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev.*, **24**, 85-106.

### F

- **FALLEH H., KSOURI R., CHAIEB K., KARRAY-BOURAOUI N., TRABELSI N., BOULAABA M. and ABDELLY C. (2008).** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *C.R. Biologies*, **331**, 372-379.
- **FAY M., WILBUR S., ABADIN H., INGERMAN L., SWARTS S. G., RESEARCH S. (2005).** Toxicological Profile for Nickel. Ed, U.S. p: 1-185.
- **FEI L., HAO L., QIPENG Y. and CHUNFANG L. (2011).** *In vitro* antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. *Food Res. Int.* **2011**, *44*, 3057–3064.
- **FELT O. (1999).** Evaluation d'un polysaccharide cationique comme véhicule pour la voie ophtalmique. Thèse de doctorat d'état. Université de Genève.
- **FIMLAND G. (2000).** A C-terminal disulfide bridge in pediocin-like bacteriocins renders bacteriocin activity less temperature dependent and is a major determinant of the antimicrobial spectrum. *J. Bacteriol.*, **182**, 2643-2648.
- **FLEMING A. (1929).** « On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to Their Use in the Isolation of *B. influenzae* », *British Journal of Experimental Pathology*, vol. 10, n° 31, p. 226-236.
- **FONG D., GAULIN C., LE M-L. , and SHUM M. (2011).** Efficacité des agents antimicrobiens de substitution pour la désinfection des surfaces dures. *National Collaborating Centre for Environmental Health Sep.2011.*
- **FOSCOLO J. AND PHILLIPON P. (1997).** Des molécules qui miment le vivant. *Biofutur* Vol.171, 14-17.
- **FRIEDMAN M., HENIKA P.R. and MANDRELL R.E. (2002).** Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *J Food Prot.* Oct. 2002; **65(10)**; pp: 1545-60.

### G

- **GÁLVEZ A., ABRIOUEL H., LÓPEZ R. L. and BENOMAR N. (2007).** Bacteriocin-based strategies for food bio-preservation. *Int. J. Food Microbiol.* , **120**: 51-70.
- **GARCIA-SALAS P., MORALES-SOTO A. , and FERNANDEZ-GUTIRREZ A. (2010).** Phenolic-compound-extraction systems for fruit and Vegetable samples. *Molecules*, **15**: 8813-8826.

## Références Bibliographiques

---

- **GILL, V. (2008).** « The Trouble with Antibiotics », *Chemistry World*, vol. 5, n° 3, mars 2008.
- **GOMES B.P., VIANNA M.E., ZAIA A.A., ALMEIDA J.F., SOUZA-FILHO F.J. and FERRAZ C.C. (2013).** Chlorhexidine in endodontics. *Braz. Dent. J.* **24** (2), pp. 89-102. Doi: 10.1590/0103-6440201302188.
- **GOÑI P., LÓPEZ P., SÁNCHEZ C., GÓMEZ-LUS R., BECERRIL R. and NERÍN C. (2009).** Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chem.* **2009**,116, 982–989.
- **GONNY M, BRADESI P, CASANOVA J (2004)** Identification of the components of the essential oil from wild Corsican *Daucus carota* L. using <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy. *Flavour Fragr. J.* **19**: 424-433.
- **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.
- **GRATIA A. (1925).** « Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille », *Compt. Rend. Soc. Biol.*, vol. 93, p. 1040-1042.
- **GRAVESEN A. (2002).** High-level resistance to class IIa bacteriocins is associated with one general mechanism in *L. monocytogenes*. *Microbiology*, **148**, 2361-2369.
- **GRYSOLE J. (2005).** La commercialisation des huiles essentielles in *Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation – Manuel pratique* : Chapitre 07. Corporation LASEVE (laboratoire d'analyse. et de séparation. des essences. végétales), Québec, pp.139-162.
- **GUALLAR E., SANZ-GALLARDO M.I., VAN'T VEER P., BODE P., ARO A., GÓMEZ-ARACENA J., KARK J.D., RIEMERSMA R.A., MARTÍN-MORENO J.M., and KOK F.J. (2002).** Heavy Metals and Myocardial Infarction Study Group. Mercury, fish oils, and the risk of myocardial infarction, *N Engl J Med.*, novembre 2002.
- **GUIRAUT J. P. (2003).** Microbiologie alimentaire. Ed. DUNOD, Paris. pp. 110-112.
- **GUSTAVO H. GOLDMAN, STEPHEN A. AND OSMANI (2007).** The Aspergilli: Genomics, Medical Aspects, Biotechnology, and Research Methods. *CRC Press*, 7. Décembre 2007. (ISBN: 9781420008517).

*H*

- **HADI M. (2004).** La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres, études et applications thérapeutiques. Thèse doctorat. Université Louis Pasteur, 155.
- **HAKIMI M., NEZHADALI A. and NAEMI A. (2008)** E-Journal of Chemistry 5, 551-556.

## Références Bibliographiques

---

- **HAMMAMI, R., A. ZOUHIR, J. BEN HAMIDA, , AND 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*. Ed. John Wiley & Sons, Ltd, United Kingdom. pp. 255 – 295.
- **HANCOCK, R. E. , and CHAPPLE, D. S. (1999).** Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.***43**, 6, 1317-23.
- **HASSAN, M., M. KJOS, I.F. NES, D.B. DIEP, , and F. LOTFIPOUR. (2012).** « Natural Antimicrobial Peptides from Bacteria: Characteristics and Potential Applications to Fight against Antibiotic Resistance», *J Appl Microbiol*, vol. 113, p. 723-736.
- **HAYASE F. , and KATO M. (1984).** Antioxidant compounds of sweet potatoes. *J. Nutrition Scientific Vitamin*, vol 30, 37-46.
- **HAYOUNI E.A., ABDERABBA M., BOUIX M. and HAMDI M. (2007).** The effects of solvent and extraction method on the phenolic contents and biological activities *in vitro* of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food chemistry*.
- **HECHARD Y., PELLETIER C., CENATIEMPO Y. and FRERE J. (2001).** Analysis of sigma(54)-dependent genes in *Enterococcus faecalis*: a mannose PTS permease (EII(Man)) is involved in sensitivity to a bacteriocin, mesentericin Y105. *Microbiology*, **147**, 1575-1580.
- **HELANDER I. M., ALAKOMI H-L. and LATVA-KAVA K. (1998).** Characterization of the action of selected essential oil components on Gram negative bacteria. *J Agric Food Chem*, vol. 46, n°9, pp. 3590-3595.
- **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.
- **HEMAISWARYA S., KRUTHIVENTI A.K. and DOBLE M. (2008).** Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine Aug. 2008.* **15(8)**; pp: 639-652. PMID: 18599280.
- **HENG, N. C. K., WESCOMBE, P. A., BURTON, J. P., JACK, R. W., and TAGG, J. R. (2007).** The Diversity of Bacteriocins in Gram-Positive Bacteria. In: Riley, M. A., and Chavan, M.(Eds). *Bacteriocins: Ecology and Evolution*. Springer Verlag. Berlin Germany. Pp 45-92.
- **HENNEBELLE T. (2006).** Investigation chimique et chimio-taxonomique et pharmacologique de Lamiales productrices d'antioxydants. *Marrubium peregrinum*, *Ballota larendana*, *Ballota pseudodictamnus* (Lamiacées) et *Lippia alba* (Verbénacées). *Phytother. I*, 3-6.

## Références Bibliographiques

---

- **HILGERS K., STOLL T., SKAKUN Y., COENEN H. H., and QAIM S. M. (2003)** Cross-section measurements of the nuclear reactions  $^{nat}\text{Zn}(d, x)^{64}\text{Cu}$ ,  $^{66}\text{Zn}(d, \alpha)^{64}\text{Cu}$  and  $^{68}\text{Zn}(p, \alpha)^{64}\text{Cu}$  for production of  $^{64}\text{Cu}$  and technical developments for small-scale production of  $^{67}\text{Cu}$  via the  $^{70}\text{Zn}(p, \alpha)^{67}\text{Cu}$  process. *Appl. Radiat. Isot., Nov-Dec2003; 59(5-6):343-51.*
- **HIMED L. (2011).** Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles de *Citrus limon*.
- **HORDÉ P. (2014).** Antimicrobien-définition. Santé-Médecine faq38590.
- **Hu Ke-Jin; Hu Jin-Lian ; Ho Kwok-Ping and Yeung Kwok-Wing. (2004).** Screening of fungi for chitosan producers, and copper adsorption capacity of fungal chitosan and chitosanaceous materials. *Carbohydrate polymers* Vol.58, (1), 45-52.

*J*

- **IMAHORI H., HAGIWARA K., AOKI M., AKIAMA T., TANIGUCHI S., OKADA T., SHIRAKAWA M. and SAKATA Y. (1996).** *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118, 11771.
- **IMELOUANE B., ELBACHIRI A., ANKIT M., BENZEID H. and KHEDID K. (2009).** Physic-chemical compositions and antimicrobial activity of essential oil of Eastern Moroccan *Lavandula dentate*. *International Journal of Agriculture & Biology*. **11**, 113-118.
- **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.

*J*

- **JACOBSEN E. G. (1993).** Catalytic asymmetric synthesis. *Ojima, Ed, VCH, New York, 1993, Chapter 4. 2.*
- **JAMIESON E.R. and LIPPARD S.J. (1999).** Structure, recognition and processing of cisplatin-DNA Adducts; *Chem Rev*, 99, 2467-2498.
- **JAYAKUMAR R., NWEN; TOHURA S. AND TAMURA H. (2006).** Sulfated chitin and chitosan as novel biomaterials. *International Journal of biological macromolecule* vol. 40, (3), 175-181.
- **JINJIANG L. (1996).** The colloidal and liquid crystal properties of surface modified chitin crystallites. Thesis of Doctor of Philosophy. Mc Gill University. Montreal, Quebec, Canada.
- **JONES G.A., MCALLISTER T.A., MUIR A.I.D. , and CHENG K.J. (1994).** Effects of Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) Condensed tannins on growth and proteolysis by four strains of ruminal bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 4 (60), 1374-1378.

## Références Bibliographiques

---

- **JUN CAI, JIANHONG YANG, YUMIN DU, LIHONG FAN, YANLIN QIU, JIN LI, JOHN F. (2006).** Purification and characterization of chitin deacetylase from *Scopulariopsis brevicaulis*. *Kennedy Carbohydrate Polymers* Vol.65, (2), 211–217.

*K*

- **KALEMBA D. and KUNICKA A. (2003).** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* **10**: 813-829.
- **KARIOTI A, VRAHIMI-HADJILOUCA T, DROUSHIOTIS D, RANCIC A, HADJIPAVLOU-LITINA D, SKAL TSA H (2006)** Analysis of the essential oil of *Origanum dubium* growing wild in Cyprus. Investigation of its antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Planta Med.* **72**: 1330-1334.
- **KAUFMANN S. (1997).** Host response to intracellular pathogens. Ed. Springer; R.G. Landes, New York; Austin, p. 345.
- **KETTLE S. F. A. (1999).** Physico-chimie inorganique, une approche basée sur la chimie de coordination, traduction française, De Boeck Université, Paris.
- **KIM H.M., SHIM I.S., BAEK Y.W., HAN H.J., KIM P.J. and CHOI K. (2013).** Investigation of disinfectants for foot-and-mouth disease in the Republic of Korea. *J; Infect. Public Health* (**5**); Oct 6<sup>th</sup> 2013, pp. 331-8. Doi: 10.1016/j.jiph.2013.04.002. Pub Med. PMID: 23999336.
- **KIMBARIS A, SIATIS N, DAFERERA D, TARANTILIS P, PAPPAS C, POLISSIOU M. (2006).** Comparison of distillation and ultrasound-assisted extraction methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic (*Allium sativum*). *Ultrason Sonochem.* **13**: 54-60.
- **KLAENHAMMER T.R. (1988).** Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, **70**, 337-349.
- **KOIDE S. S. (1998).** Chitin-chitosan: properties, benefits and risks. *Nutrition Research* Vol.18, (6), 1091-1101.
- **KONE W.M., KAMANZI ATINDEHOU K., TERRAUX C., HOSTETTMANN K., TRAORE D. and DOSSO M. (2004).** Traditional medicine in North Côte-D'ivoire: screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. *J. Ethnopharmacol*, **93**, 43-49.
- **KREOF SKY T., SCHLAGER J.W., VUK-PAVLOVIC Z., ABRAHAM R.T. and ROHRBACH M.S. (1992).** Condensed tannin promotes the release of arachidonic acid from rabbit resident alveolar macrophages. *Am. J. Resir. Cell. Biol*, **7**, 172-181.
- **KRISHNA C. (2005).** "Solid-State Fermentation Systems-An Overview." *Critical Reviews in Biotechnology* **25**: 1-30.
- **KUMARA R., SANGEETA OBRAIA, JOSHIB V K,VIKAS KUMARB and SIYAMAK SHAHABC (2015).** Computational, crystal structure and antimicrobial studies of directly synthesized dichloroethylenediaminecopper (II) complex. *Commun. Inorg. Synth.* Vol. 3, N°1 (2015), 9-15.
- **KURITA K. (1997).** Applications of chitin and chitosan. Goosen MFA, editor. Lancaster, PA. p. 297.

### L

- **LAMBERT R. J., SKANDAMIS P. N. and COOTE P. J. (2001).** A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl Microbiol*, vol. 91, n°3, pp. 453-462.
- **LARNOY E., DANTZ S., MORTEN E. and MILITZ H. (2006).** Screening of properties of modified chitosan-treated wood. *Wood Material Science and Engineering*, 2006, vol.1, p.59-68.
- **LAURANCE D. HALL AND MANSUR YALPANI. (1980).** Enhancement of the metal- chelating properties of chitin and chitosan. *Preliminary Communication Carbohydrate Research*, (83), C5-C7.
- **LECLERC H., GAILLARD J-L. AND MICHEL S. (1995).** Microbiologie générale. La bacteria et le monde bactérien. 535. Doin éditeurs, Paris.microorganisms in vitro. *Peptides*, **31**: 2003-2008.
- **LIDDELL P. A., SUMIDA J. P., MACPHERSON A. N., NOSS L., SEELY G. R., CLARK K. N., MOORE A. L., MOORE T. A. and GUST D.(1994).** *Photochem. Photobiol.*, 1994, 60, 265.
- **LIMA I.S, RIBEIRO E.S, AIROLDI C. (2006).** The use of chemically modified chitosan with succinic anhydride in the methylene blue adsorption. *Quim Nova*.
- **LOSADA J., DEL PESO I. and BEYER L. (2001).** *Inorganica Chimica Acta.* , 2001, **321**, 107-115.

### M

- **MABRY T.J. , and MATULA A. (1992).** Chemistry and utilization of phenylpropanoids including flavonoids, coumarins and lignans. *J. Agric. Food Chem.*, 28, 188-196.
- **MACHEIX J., FLEURIET A. , and JAY-ALLEMAND C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux (Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique). Ed Presses polytechnologiques et universitaires romandes, Lavoisier, 4-5.
- **MAGNUSON J. K. , and LASURE L. L. (2004).** "Organic acid production by filamentous fungi." In : Tkacz JS, Lange L (eds) *Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture and Medicine*. Springer.: 307-340.
- **MAHEROU J., NOREST S. , and FERRER L. (2013).** Les métaux lourds, quels risques pour la santé ? *Association Santé Environnement France*127134137311767.
- **MANSOUR N., OUYED L , and SADEG S. (2010).** Détermination de l'activité antibactérienne de quelques huiles essentielles et leur application sur deux types de viande de dinde : commerciale de domestique. Thèse d'ingénieur. Université Mouloud Mammeri. Tizi Ouzou.88.
- **MANSOURI I. , and AKROUT N. (2014).** Synthèse et caractérisation de deux bases de Schiff tri-et pentadentée et leurs complexes de Ni(II) et Cu(II). Etude de leur activité biologique vis-à-vis de certaines souches bactériennes. *Université des Sciences et de la Technologie Mohamed Boudiaf d'Oran*.

## Références Bibliographiques

---

- **MANTLE D., ANDERTON J.G., FALCOUS G., BARNES M., JONES P., and PERRY E.K. (1998).** Comparison of methods for determination of total antioxidant status: application to analysis of medicinal plant essential oils. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* **121**: 385-391.
- **MASQUELIER J., DUMON M.C. , and DUMAS J. (1979).** Stabilisation des collagènes par des oligomères procyanidoliques. *Acta therapeutique*, 1, 101-104.
- **MATSUZAKI K. (1999).** Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim Biophys Acta.* **1462**, 1-2, 1-10.
- **MAYAUD L., CARRICAJA A., ZHIRI A. and AUBERT G. (2008).** Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics. *Lett. Appl. Microbiol.* Sep. 2008; **47(3)**; pp: 167-173.
- **MCAULIFFE O. and HILL C. (2001).** Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol. Rev.*, **25**, 285-308.
- **MICHIEL S. J., MISSOTTEN, FREMAUT D., DE SMET S., DIERICK N. (2007).** In vitro dose-response of carvacrol, thymol, eugenol and trans-cinnamaldehyde and interaction of combinations for the antimicrobial activity against the pig gut flora. *Department Biowetenschappen en Lands-chaps-architectuur, Hog school Gent, Voskenslaan 270, 9000 Ghent, Belgium.*
- **MILOŠ V. NIKOLIĆ A, MARINA Ž . MIJAJLOVIĆ A, VERICA V. JEVTIĆ 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 thiosalicylic acid. *Polyhedron* 79 (2014) 80–87.
- **MISAGHI A. and BASTI A.A. (2007).** Effects of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil and nisin on *Bacillus cereus* ATCC 11778. *Food Control* **2007**, 18, 1043–1049.
- **MKRTCHYAN, H., GIBBONS, S., HEIDELBERGER, S., ZLOH, M., LIMAKI, H.K. (2010).** Purification
- **MOMPON B., LEMAIRE B., MANGAL P. , and SURBLED M. (1998).** Extraction des polyphénols : du laboratoire à la production industrielle. Ed. INRA, Paris(les colloques, N°87).
- **MORENCY H., MOTA-MEIRA M., LAPOINTE G., LACROIX C. and LAVOIE M. C. (2001)** Comparison of the activity spectra against pathogens of bacterial strains producing a mutacin or a lantibiotic. *Can J Microbiol.***47**: 322-331.
- **MORFIN I., HAZOT P., GUILLOT F., SOLER C., KORWIN-ZMIJOWSKA C., TAHIRI K., CHEVALIER X., CORVOL M., and DOMARD A. (2002).** Percolating hydrogels for tissue engineering. *Europ. Cells and Materials.* Vol.4, (1), 55-56.
- **MORISSET D., and FRERE J. (2002).** Heterologous expression of bacteriocins using the enteric Y105 dedicated transport system by *Leuconostoc mesenteroides*. *Biochimie.* **84**, 5-6, 569-76.

## Références Bibliographiques

---

- **MRUNAL R. T. (2004).** Synthesis and antibacterial assessment of water- soluble hydrophobic chitosan derivatives bearing quaternary ammonium functionality. Doctor of philosophy. Louisiana State University.
- **MUSIOL R., MROZEK-WILCZKIEWICZ A. and POLANSKI J (2014).** Synergy against fungal pathogens: working together is better than working alone. *Curr. Med. Chem. March 2014*; **21(7)**; pp: 870-893.
- **MUZZARELLI A. and RICCARDO A. (1983).** Chitin and its derivatives: New trends of applied research. *Carbohydr. Polym.* Vol.3, (1), 53- 75.
- **MUZZARELLI R. A. A., and MUZZARELLI C. (2006).** Chitosan Chemistry: Relevance to the Biomedical Sciences. *Adv Polym Sci.* Vol.186, 151–209.

*N*

- **NAZEF, L., BELGUESMIA, Y., TANI, A., PRÉVOST, H., and DRIDER D. (2008).** Identification of lactic acid bacteria from poultry feces: evidence of anti-*Campylobacter* and anti-*Listeria* activities. *Poultry Science*, **87**: 1-6.
- **NEETU DAHIYA. RUPINDER TEWARI, GURINDER SINGH HOONDAL. (2006).** Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Appl Microbiol Biotechnol.* Vol.71, (6), 773–782. Nouvellement isolés et identifiés. Thèse de Doctorat. Université de Toulouse.
- **NES I. F., DIEP D. B., and HOLO H. (2007)** Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J Bacteriol.***189**: 1189-1198.
- **NIGUTOVA K. 2007.** Production of enterolysin A by rumen *Enterococcus faecalis* strain and occurrence of enlA homologues among ruminal Gram+ cocci. *J. Appl. Microbiol.*, **102**(2), 563-569.
- **NILSEN T., NES I.F. and HOLO H. 2003.** Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG2333. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**(5), 2975-2984.
- **NISSEN-MEYER J. , and NES I. F. (1997).** Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. *Arch Microbiol.* **167**, 2-3, 67-77.
- **NOVAK, R., HENRIQUES B., CHARPENTIER E., NORMARK S., , and TUOMANEN E. (1999).** « Emergence of Vancomycin Tolerance in *Streptococcus pneumoniae* », *Nature*, vol. 399, p. 590-591.

*O*

- **OIV (2009).** Les dérivés de chitine : le chitosane. Organisation Internationale de la vigne et du vin. République Française.
- **OKUDA T., KIMURA Y., YOSHIDA T., HATANO T., OKUDA H. and ARICHI S. (1983).** Studies on the activities of tannins and related compounds from medicinal plants and drugs. Inhibitory effects of lipid peroxidation in mitochondria and microsome of liver. *Chem. Phar. Bull.* 31.

## Références Bibliographiques

---

- **OKUMURA H., MIMURA A., YAKOU Y., NIWANO M. and TAKAHARA Y. (1993).** Antioxidant activity of tannins and flavonoids in *Eucalyptus rostrata*. *Phytochem*, 33, 557-561.
- **ONESIPPE C. (2005).** Etude des systèmes polyélectrolytes/Tensioactif en phase aqueuse et l'interface liquide/gaz. Application à l'élaboration de micro – capsules. *Thèse de doctorat, Ecole Doctorale : Science chimiques et physique, Université de Montpellier II, France.*
- **OPPEGARD C. (2007).** The two-peptide class II bacteriocins: structure, production and mode of action. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, **13**(4), 210-219.
- **ORTURNO A., BAIDEZ A., GOMEY P. and ARENAS M.C. (2005).** Citrus parasidi and Citrus sinensis flavonoids: Their influence in the defense mechanism against *Penicillium digitatum*, Thèse magister, Université de Constantine, 81.
- **OSUNLAJA A.A., NDAHI P. N. and AMEH J.A. (2009).** Synthesis, physico-chemical and antimicrobial properties of Co (II), Ni (II) and Cu (II) mixed-ligand complexes of dimethylglyoxime – Part I. *African Journal of Biotechnology Vol.8 (1)*. Pp. 004-011. January, 2009.
- **OUSSALAH M., CAILLET S. and LACROIX M. (2006).** Mechanism of Action of Spanish Oregano, Chinese Cinnamon, and Savory Essential Oils against Cell Membranes and Walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot*, vol. 69, n°5, pp. 1046-55.



- **PAPAGIANNI M. (2003).** Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function and applications. *Biotechnol. Adv.*, **21**(6), 465-499.
- **PAPAGIANNI M. (2007).** Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnology Advances*, vol. 25, n° 3, mai2007, p. 244–263.
- **PARIZE P. (2008).** Antifungal Therapy of *Aspergillus* Invasive Otitis Externa: Efficacy of Voriconazole and Review. *Antimicrob. Agents Chemother.* Décembre 2008.
- **PATTON G.C., and VAN DER DONK W.A. (2005).** New developments in lantibiotic biosynthesis and mode of action. *Curr. Opin. Microbiol.*, **8**, 543-551.
- **PAULI A. and SCHILCHER H. (2010).** *In Vitro* Antimicrobial Activities of Essential Oils Monographed in the European Pharmacopoeia 6th 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., pp.353-548.
- **PERCIVAL S. (2004).** Microbiology of waterborne diseases. *Ed. Elsevier Academic Press. Amsterdam. Boston, 480.*
- **PERRETIN V.F., SHWARTZ L., CRISTA M., BOEGILIN G., DASEN , and M.TEUBER. (1997).** Antibiotic résistance spread in food, *Nature*.389:801-802.

## Références Bibliographiques

---

- **PH. E. (2004).** Pharmacopée Européenne, *II<sup>e</sup> ED., XVI FASC., MAISONNEUVE SA, SAINTE-RUFFINE, FRANCE. (2004).*
- **PIBIRI M.-C., (2006).** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. *Thèse no 3311.* Faculté Environnement Naturel, architectural et construit, Institut des Infrastructures, des Ressources et de l'Environnement, Section d'Architecture, Ecole polytechnique Fédérale de Lausanne.
- **PLASSARD C. , and FRANSSON P. (2009).** "Regulation of low-molecular weight organic acid production in fungi." *Fungal Biology Reviews* **23**: 30-39.
- **PONCE A.G., FRITZ R., DEL VALLE C. and ROURA S.I. (2003).** Antimicrobial activity of essential oils on the native micro-flora of organic. *Swiss. Chard.* **36**, 679–684.
- **POOLE K. (2002).** Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *J Appl Microbiol.* **92 Suppl**, 55S-64S.
- **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
- **PRASAD P. and KAPOOR K. (2004).** Multidrug resistance in yeast *Candida*. *Int. Rev. Cytol*, **242**, 215-248.
- **PRESSINDUSTRIA SPA (2004).** INSTITUTE OF BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY OF MICROORGANISMS RUSSIAN ACADEMY OF SCIENCE. *BREVET D'INVENTION EN ITALIE NO 01256043, 21 NOV. (2004).*
- **PREYANAT V., WARAYUT S., WATCHARA K., DAMRUS S. AND PRACHYA K. (2003).** Anticoagulant activities of the chitosan polysulfate synthesized from marine crab shell by semi- heterogenous conditions. *Science Asia* Vol.29, 115-120.
- **PRUNET R., BOURDINET D. , and PREVOTEAU D. (1996).** Structure de la matière, Chimie inorganique. Sciences et technologies de laboratoire.

### R

- **RABEA I., BADAWY M.E.T., STEVENS C.V., SMAGGHE G. and STEURBAUT W. (2003).** Chitosane as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*, vol.4, n°6, p.1457-1465.
- **RAMAN N., SAKTHIVEL A. and PRAVIN N. (2014).** Exploring DNA binding and nucleolytic activity of few 4-aminoantipyrine based amino acid Schiff base complexes: a comparative approach. *Copyright © 2014 Elsevier B.V.*
- **RASOOLI I. (2007):** food preservation – a bio-preservative approach, *food global science books* **1(2)**, p:111.
- **RASOOLI I., REZAEI M.B., and ALLAMEH A. (2006).** Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Infect. Dis.* **10**: 236-241.

## Références Bibliographiques

---

- **RAVN H., ANDARY C., KOVACS G. and MOLGRAD P. (1984).** Caffeic acid esters as in vitro inhibitors of plant pathogenic bacteria and fungi. *Biochem. Syst. Ecol.*, 17, 175-184.
- **REDDY K.V., ARANHA C., GUPTA S.M., and YEDERY R.D. (2004).** « Evaluation of Antimicrobial Peptide Nisin as a Safe Vaginal Contraceptive Agent in Rabbits: In Vitro and in Vivo Studies », *Reproduction*, vol. 128, p. 117-126.
- **RICHARD C. 2006.** Evidence on correlation between number of Disulfide Bridge and toxicity of class IIa bacteriocins. *Food Microbiol.* **23**(2), 175-183.
- **RINAUDO M., (2013).** Chitosane et soin des cheveux. CERMAV-CNRS Centre de recherches sur les macromolécules végétales.
- **RINAUDO M., PAVLOV G. and DESBRIÈRES J. (1999).** Solubilization of chitosane in strong acid medium. *Int. J. Polym. Anal. Charact.*, 5, 1999, 267-276.
- **RODER, B.L., WANDALL D.A., FRIMODT-MOLLER N., ESPERSEN F., SKINHOJ P., and ROSDAHL V.T. (1999).** « Clinical Features of *Staphylococcus aureus* endocarditis: A 10-year Experience in Denmark », *Arch. Inter. Med.*, vol. 159, 1999, p. 462-469.
- **RODRIGUES, C. (2009).** "Improvement on Citric Acid Production in Solid-State Fermentation by *Aspergillus niger* LPB BC Mutant Using Citric Pulp." *Applied Biochemistry and Biotechnology* **158**: 72-87.
- **RÖHR M., KUBICEK C.P., and KOMINEK J. (2000).** CITRIC ACID. In *BIOTECHNOLOGY, VOL. 3, P. 420-454, VCH VERLAGSGESELLSCHAFT, WEINHEIM (RFA) (2000).* « GRAS Status of Nisin Issued by the FDA ». [http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/gras\\_notices/grn0065.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/gras_notices/grn0065.pdf).
- **ROSENBERG B. (1978).** Platinum complex-DNA interactions and anticancer activity; *Biochimie*, 60, 859-867.
- **ROZIER J., CARLIER V., and BOLNOT F.(1986).** Bases microbiologiques de l'hygiène des aliments. É d. SAPALC. Paris. pp. 130-143.

### S

- **SALZER U.J. (1977).** The analysis of essential oils and extracts (oleoresins) from seasonings acritical review. *C.R.C Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **9**: 345-373.
- **SAMSON R.A., HOUBRAKEN J., SUMMERBELL R.C., FLANNIGAN B. AND MILLER J.D. (2001).** Common and important species of fungi and actinomycetes in indoor environments. In: *Microorganisms in Home and Indoor Work Environments.* New York: Taylor & Francis. p. 287–292. ISBN.
- **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.
- **SARKER S.D, LATIF Z.I. and GRAY A.I. (2005).** Natural product isolation. In: *Natural product isolation. Humana Press. (Totowa),* 2-10.

## Références Bibliographiques

---

- **SARRANO M.A., MARTÍNEZ-ROMERO D., GUILLE'N F., VALVERDE J.M., ZAPATA P.J., CASTILLO S., and VALERO D. (2008).** The addition essential oils to MAPas a tool to maintain overall quality of fruits. *Trends in Food science & Technologie*. 19, 464-471.
- **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 Microbiol*, vol. 8, p. 186.
- **SCOTT J. and BRADBURY R. (1994).** Pharmacokinetic dosing of carboplatin; *Fla J Hosp Pharm*, 14, 17-18.
- **SÉON A.A. , and SIMÕES NUNES C. (2009).** Évaluation *in vitro* des effets de différents acides organiques sur trois sérovars de *Salmonella enterica* d'origine porcine. Avec la collaboration technique de Cathleen Lesmale, Angélique Gorlier et Stéphane Barba Duarte. *DSM NUTRITIONAL PRODUCTS FRANCE, Centre de Recherche en Nutrition et Santé Animale (C.R.N.A.), BP 170, 68305 Saint Louis cedex, France 2009.* Journées Recherche Porcine, 41, 1-x.
- **SHAHIDI F. and ABUZAYTOUN R. (2005).** Chitin, chitosan, and co-products: chemistry, productions, applications, and health effects. *Adv. Food Nutr. Res.*, 49: 93-135.
- **SHAHIDI F., JANAK K. V. A. and JEON Y-J. (1999).** Food applications of chitin and chitosans. *Tends in Food Sci. and Techno.* Vol.10, (2), 37-51.
- **SHAN B., CAI Y.Z., BROOKS J.D. and CORKE H. (2007).** The *in vitro* antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology*, 117, 112-119.
- **SHRIVER D.F. and ATKINS P.W. (2001).** Chimie inorganique, Traduction française, De Boeck Université, Paris.
- **SINGH S.B. and BARRETT J.F. (2006).** Empirical antibacterial drug discovery foundation in natural products. *Biochem. Pharmacol.* 71, pp : 1006-1015.
- **SMAOUI S. (2010).** Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes.
- **SOCCOL, C. R. (2008).** "Production of organic acids by solid state fermentation." In : A. Pandey, C.R Soccol, C. Larroche (eds) *Current Developments in Solid State Fermentation*. Springer.: 205-229.
- **SOGIAS I.A., KHUTORYANSKIY V.V. and WILLIAMS A.C. (2010).** *Macromol. Chem. Phys.* 2010, DOI: 10.1002/ macp.200900385.
- **SOKMEN A., GULLUCE M., ASKIN AKPULAT H., DAFERERA D., TEPE B., POLLISIOU M., SOKMEN M. and SAHIN F. (2004).** The *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. *Food Control*, 15, 627-634.
- **SOULSBY L. (2007).** « Antimicrobials and Animal Health: A Fascinating Nexus », *J Antimicrob Chemother*, vol. 60, suppl. 1, p. i77-78.

## Références Bibliographiques

---

- **SPEICIENE VILMA, FABIEN GUILMINEAU, ULRICH KULOZIK, DAIVA LESKAUSKAITE. (2007).** The effect of chitosan on the properties of emulsions stabilized by whey proteins. *Food Chemistry* Vol.102, (4), pp: 1048–1054.
- **STAVRIC B. , and MATULA T.I. (1992).** Flavonoids in food. Their significance for nutrition and heart. In : ONG ASH et Packer L, Eds, Lipid soluble and antioxidants: biochemistry and clinical applications, Brasel : Birkhauser Verlag, 274-294.
- **STEVEN P., RACHEL C., MARTHA E., PAUL H., JANE S. and PETER W.J. (2004).** Microbiology of waterborne diseases. *Ed. Elsevier Academic Press.*71-132.
- **SUMNER L, AMBERG A, BARRETT D, BEALE M, BEGER R, DAYKIN C, FAN TW-M, FIEHN O, GOODACRE R, GRIFFIN J, HANKEMEIER T, HARDY N, HARNLY J, HIGASHI R, KOPKA J, LANE A, LINDON J, MARRIOTT P, NICHOLLS A, REILY M, THADEN J, VIANT M (2007)** Proposed minimum States, merck & co. inc., 2350-2564, 2001.
- **SURESH P.V. and CHANDRASEKARAN M. (1998).** Utilization of prawn waste for chitinase production by the marine fungus *Beauveria bassiana* by solid state fermentation. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* Vol.14, (5), 655-660.

*T*

- **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.
- **TAILLANDIER P., JOANNIS-CASSAN C., JENTZER J.-B., GAUTIER S., SIECZKOWSKI N., GRANES D. AND C. BRANDAM (2014).** Effect of a fungal chitosane preparation on *Brettanomyces bruxellensis*, a wine contaminant. *Journal of Applied Microbiology*, **118**, 123-131.
- **THAKUR R.L., and ROY U. (2009).** Antibacterial activity of *Leuconostoc lactis* isolated from raw cattle milk and its preliminary optimization for the bacteriocin production. *Res. J. Microbiol.* , **4**: 122-131.
- **THERUVATHIL K. SINI, SETHUMADHAVAN SANTHOSH and PARUTHAPARA T. MATHEW. (2007).** Study on the production of chitin and chitosan from shrimp shell by using *Bacillus subtilis* fermentation. *Carbohydrate Research* Vol.342, 2423–2429.
- **TOLAIMATE A., DESBRIERES J., RHAZI M., and ALAGUI A. (2003).** Contribution to the preparation of chitins and chitosans with controlled physico-chemical properti. *Polym.*, 44: 7939-7952.
- **TOMIC, S. (2010).** "L'émergence d'une spécialité : la chimie organique." Editions PUR. Aux origines de la chimie organique: 1-2.
- **TONG Z., DONG L., ZHOU L., TAO R. and NI L. (2010).** Nisin inhibits dental caries-associated.
- **TROMBETTA D., CASTELLI F., SARPIETRO M.G., VENUTI V., CRISTANI M., DANIELE C., SAIJA A., MAZZANTI G. and BISIGNANO G. (2005).** Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 2474-2478.

## Références Bibliographiques

---

- **TURGEON M. (2001).** Profil des produits forestiers-Première transformation-Huiles essentielles. Ministère des ressources naturelles. www.mrn.gouv.qc.ca.
- **TURKMEN N., VELIOGLU Y.S., SARI F. and POLAT G. (2007).** Effect of extraction conditions on measured total polyphénols contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea. *Molecules*, **12**, 484-496.
- **TWOMEY D., RYAN M., MEANEY B. and HILL C. (2002).** Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. *Antonie van Leeuwenhoek*, **82**, 165-185.
- **TZUNG K.W. (2001).** Genomic evidence for a complete sexual cycle in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 3249-3253.

### U

- **ULTEE A. and SMID E.J. (2001).** Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *Int. J. Food Microbiol.* **64**: 373-378.
- **ULTEE A., BENNIK M.H. and MOEZELAAR R. (2002).** The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 1561-1568.
- **ULTEE A., SLUMP R.A., STEGING G. and SMID E.J. (2000).** Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. *J. Food Prot.* **2000**, *63*, 620-624.
- **URQUIAGA I. and LEIGHTON F. (2000).** Plant polyphenol oxidants and oxidative stress. *Biological research*, *33* (2), 55-64.

### V

- **VADYVALOO V., SNOEP J.L., HASTING J.W. and RAUTENBACH M. (2004).** Physiological implications of class IIa bacteriocin resistance in *L. monocytogenes* strains. *Microbiology*, **150**, 335-340.
- **VELAZQUEZ MORALES P. (1997).** Synthèse et caractérisation de nouveaux électrolytes polymères à base de chitosane. *Thèse Sciences et Génie des Matériaux. Saint-Martin d'Hères : EFPG, 1997, 175 p.*

### W

- **WALTON P.H. (1998).** Beginning Group Theory for Chemistry, *Workbooks in Chemistry, Oxford University Press, Oxford.*
- **WANG SL., CHANG WT. AND LU M. C. (1995).** Production of chitinase by *Pseudomonas aeruginosa* K- 187 using shrimp and crab shell powder as a carbon source. *Proc. Natl. Sci. Counc. Repub. China B.* Vol.19, (2), 105-112.
- **WEIGEL L.M., CLEWELL D.B., GILL S.R., CLARK N.C., MCDUGAL L.K., FLANNAGAN S.E., KOLONAY J.F., SHETTY J., KILLGORE G.E. , and**

## Références Bibliographiques

---

**TENOVER FC. (2003).** « Genetic Analysis of a High-level Vancomycin-resistant Isolate of *Staphylococcus aureus* », *Science*, vol. 302, p. 1569-1571.

- **WEN Y.Z, LIU W.Q, FANG Z.H, LIU W.P.(2005).** Effects of adsorption interferents on removal of reactive red 195 dye in wastewater chitosan. *J Environ Sci China*.
- **WENDA KOON C. and SAKAGUCHI M. (1995).** Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *Journal of food Products*, **58**, 280-283.
- **WESTON, J. S. (2002).** Treatment of gram-positive infections: past, present, and future. *Crit Care Nurs Clin North Am.* **14**, 1, 17-29.

Y

- **YERJÖEN T. (2004).** Extraction and planar chromatographic separation techniques in the analysis of natural products. Faculty of pharmacy of the University of Helsinki, 76.
- **YONGYU Z., SHUJUN S., JIANYE D., WENYU W., HUIJUAN C., JIANBING W., XIAOJUN G. (2011).** Quality Control Method for Herbal Medicine - Chemical Fingerprint Analysis. In: Shoyama Y (ed) Quality Control of Herbal Medicines and Related Areas. InTech, pp 171-194.
- **YOON J.I., BAJPAI V.K. and KANG S.C. (2011).** Synergistic effect of nisin and cone essential oil of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu against *Listeria monocytogenes* in milk samples. *Food Chem. Toxicol.* **2011**, 49, 109–114.

Z

- **ZEMMOURI H. (2014).** Le Chitosane ... est-il la molécule du siècle ? *Division Bioénergie et Environnement*.
- **ZHU X., JIBAO C., YANG J. and SU Q. (2005).** Determination of glucosamine in impure chitin samples by high-performance liquid chromatography. *Carbohydrate Research* Vol.340, (10), 1732–1738.
- **ZORE G.B., THAKRE A.D., JADHAV S. and KARUPPAYIL S.M. (2011).** Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. *Phytomedicine* **2011**, 18, 1181–1190.

*Annexes*

**Annexe 1 : Matériel de laboratoire utilisé**



Autoclave.



Etuve.



Microscope optique.



Balance électrique.



Agitateur.



Micropipettes.



Cellule de Thoma.



Bain-marie.

**Annexe 2 : Composition des milieux de culture utilisés.**

La Gélose Mueller Hinton (MH) est utilisée pour la préculture des bactéries, la mise en évidence de l'activité antibactérienne des différents agents antimicrobiens testés, ainsi que pour la détermination de la CMI et la CMB.

Le milieu Sabouraud est utilisé pour la préculture des souches fongiques, la mise en évidence de l'activité antifongique des différents agents antimicrobiens testés, ainsi que pour la détermination de la CMI et la CMF.

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

Composition en g/l des milieux de culture utilisés :

➤ **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.

➤ **Gélose Sabouraud**

Peptone pepsique.....	10g
Glucose.....	20g
Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000ml

pH=5,8

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 3 : 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 ;
- **Mordantage** : Plonger la lame dans une solution de Lugol pendant 45 secondes pour fixer le colorant ;
- Replonger la lame dans le Lugol pendant 45 autres secondes, puis rejeter le mordant ;
- **Décoloration** : Effectuer, ensuite, une décoloration à l'alcool éthylique laisser agir 30 secondes. Le but 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.