

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOULOU D MAMMERI DE TIZI-OUZOU
FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE-MICROBIOLOGIE



MEMOIRE

De fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de master académique

Filière : biologie

Spécialité : biotechnologie microbienne

Thème

Evaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Mentha x piperita* L. et *Cupressus sempervirens* L.

Travail réalisé par :

M^{elle} : ALIANE LOUIZA

M^{elle} : AMAZOUZ AMIRA-KAHINA

Devant le jury :

PRESIDENT: Mr YEZID H. Maitre de conférences B à l'UMMTO

PROMOTEUR : Mr OUELHADJ A. Maitre de conférences A à l'UMMTO

EXAMINATRICE : M^{me} BENZAOUZ K. Maitre assistante A à l'UMMTO

EXAMINATRICE: M^{elle} BENAHMED DJILALI A. Maitre de conférences A à l'UMMTO

Année universitaire : 2016/2017

Remerciements

Le grand merci s'adresse au bon dieu le tout-puissant, de nous avoir donné la force, la volonté et la patience, et qui nous a guidé et éclairé notre chemin tout au long de notre parcours jusqu'à ce jour.

Au terme de ce travail, il nous tient à cœur d'adresser nos remerciements les plus distinguées aux personnes qui ont contribué de près ou de loin à ce que ce travail soit à la hauteur.

Nos remerciements vont particulièrement à :

Mr OUELHADJ A., maitre de conférences A à l'UMMTO qui nous a honorés en acceptant de diriger ce travail avec une grande rigueur scientifique, pour son soutien, ces conseils en or et pour sa disponibilité permanente.

Qu'il trouve ici nos sentiments de gratitude et de déférence.

Mr YEZID H., maitre de conférences B à l'UMMTO, pour nous avoir fait l'honneur de présider notre jury.

M^{me} BENZAOUZ K., maitre assistante A à l'UMMTO d'avoir bien voulu lire et juger notre travail.

M^{elle} BENAHMED DJILALI A., maitre de conférences A à l'UMMTO d'avoir accepté de faire partie de notre jury et de participer à l'évaluation de notre travail.

Le personnel du laboratoire pédagogique de microbiologie de l'UMMTO de nous avoir soutenu et encouragé tout le long de notre travail, ainsi que nos camarades au sein du laboratoire qui nous en soutenue moralement et aider de leur possible.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à mes parents : Mahfoud et Maliaka, qui m'ont soutenu tout au long de mon cursus scolaire et universitaire, ainsi qu'à mon fiancé Essaidh qui a toujours été là pour moi et mes beaux-parents ; Omar et Zahra.

A mes frères: Sofiane, Idir, Lies

A ma belle-sœur ; Lysiane

A mes neveux ; Masten et Adam

A mes grands-mères Sadia et Ourdia

Sans oublier tous mes amies et camarades à l'UNM70.

LOUZA

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à mes parents : Said et Fettouma, qui m'ont soutenu tout au long de mon cursus scolaire et universitaire.

A mes sœurs : Ranya et Lydia

A la mémoire de mes grands-mères Fatma et Malha

Sans oublier tous mes amis et camarades à l'UNM70,

ainsi qu'à toutes mes tantes et tous mes oncles.

AMIRA

Liste des abréviations

ATB	Antibiotique
ATCC	American Type Culture Collection
BHIB	Brain Heart Infusion Borth
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CMB	Concentration Minimale Bactéricide
DMSO	Dimethylsulfoxyde
DO	Densité Optique
GC/MS	Chromatographie en phase Gazeuse Spectrométrie de Masse
HE	Huiles (s) Essentielle (s)
MH	Muller Hinton
mm	millimètre
nm	nanomètre
OMS	Organisation Mondiale de Santé
UFC	Unité Formant Colonie
µl	Microlitre
pH	potentiel Hydrogène
V/V	Volume/Volume

Liste des tableaux et figures

Liste des tableaux

Tableau I : Les parties de certaines plantes riches en huiles essentielles	4
Tableau II : tableau descriptif des différentes bactéries utilisées pour le test de l'activité antibactérienne des deux huiles essentielles.....	43
Tableau III : Tableau descriptif des deux souches fongiques utilisées pour le test de l'activité antifongique des deux huiles essentielles	44
Tableau IV : tableau descriptif des milieux de cultures utilisés	44
Tableau V : les antibiotiques et l'antifongique utilisé.....	45
Tableau IV : description des deux huiles essentielle testées	46
Tableau VII : les appareils utilisés	46
Tableau VIII : Valeurs des dilutions utilisées pour déterminer les CMI.....	51
Tableau IX : Caractères morphologiques des souches bactériennes étudiés	56
Tableau X : tableau récapitulatifs des zones d'inhibition des témoins positifs	60
Tableau XI : Résultats des diamètres d'inhibition en mm (moyenne \pm l'écart type) de l'activité antibactérienne de l'H.E de <i>Mentha x piperita</i> L.	62
Tableau XII : Résultats des diamètres d'inhibition en mm (moyenne \pm l'écart type) de l'activité antibactérienne de l'H.E de <i>Cupressus sempervirens</i> L.	64
Tableau XIII : Caractères macroscopiques et microscopiques d' <i>Aspergillus niger</i>	78
Tableau XIV : tableau illustrant le diamètre d'inhibition de l'antifongique utilisé contre les deux souches fongiques	80
Tableau XV : Résultats des diamètres d'inhibition en mm (moyenne \pm l'écart type) de l'activité antifongique de l'H.E de <i>Mentha x piperita</i> L	82

Tableau XVI : Résultats des diamètres d'inhibition en mm (moyenne \pm l'écart type) de l'activité antifongique de l'H.E de *Cupressus sempervirens* L..... 84

Liste des figures

Figure 1 : trichome glandulaire de la menthe verte (coupe longitudinale) vue sous microscope optique.....	5
Figure 2 : cavité de sécrétion dans une feuille de citron vue sous sa coupe transversale sous microscope optique.....	5
Figure 3 : Biosynthèse des terpènes	8
Figure 4 : structures de monoterpènes, incluant des composés insecticides (α - et β -pinene pyrethrin), des pollinisateurs (linalool et 1,8-cineole), et des agents anti-herbivores (1,8-cineole).....	9
Figure 5 : structure chimique de certains composés aromatiques.....	11
Figure 6 : Schéma représentant l'extraction des huiles essentielles	12
Figure 7 : Schéma du principe de la technique d'hydrodistillation	13
Figure 8 : Entraînement à la vapeur d'eau ascendante et descendante.....	13
Figure 9: différents types d'extraction par solvants volatils.....	14
Figure 10 : Système d'extraction des huiles essentielles par micro-ondes.....	15
Figure 11 : Emplacements et mécanisme d'action, considérés comme des sites d'action pour l'HE dans la cellule bactérienne	19
Figure 12 : image d' <i>E.coli</i> O157:H7 vue sous microscope électronique à balayage (x12000) après traitement avec l'huile essentielle d'origan	20
Figure 13 : photographie de <i>Cupressus sempervirens</i> L.....	28
Figure 14 : Aire de répartition du <i>Cupressus sempervirens</i> L.....	29
Figure 15: photographie de <i>Mentha x piperita</i> L	31
Figure 16 : Différents mécanismes de résistance aux antibiotiques dans une bactérie Gram négatif.....	36
Figure 17 : Représentation schématique des cinq familles de pompes à efflux bactériennes .	39
Figure 18 : Stratégies et les cibles bactériennes utilisées pour lutter contre la résistance aux antibiotiques	42
Figure 19 : Détermination de la zone d'inhibition par la méthode de diffusion des disques ..	50
Figure 20 : Photographies des témoins négatifs des souches référenciées et pathogènes testées pour l'activité antibactérienne des deux HEs.....	57

Figure 21 : Photographies des témoins positifs des souches référenciées et pathogènes testées vis-à-vis des antibiotiques utilisés	59
Figure 22 : Photographies des tests de sensibilités des souches bactériennes vis-à-vis de l'huile essentielle de <i>Mentha x piperita</i> L.	61
Figure 23 : Photographies des tests de sensibilités des souches bactériennes vis-à-vis de l'huile essentielle de <i>Cupressus sempervirens</i> L.....	63
Figure 24 : Représentation graphique du test de sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis des deux huiles essentielles testés ; l'HE de <i>Mentha x piperita</i> L. et celle de <i>Cupressus sempervirens</i> L.....	65
Figure 25 : Résultat d'ensemencement d'un échantillon tiré du tube n°3 où il n'y a pas eu de croissance bactérienne visible de la souche <i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876.....	71
Figure 26 : Résultat d'ensemencement (CMB) d'un échantillon tiré du tube n°6 où il n'y a pas eu de croissance bactérienne visible de la souche <i>Escherichia coli</i>	72
Figure 27 : Résultat d'ensemencement d'un échantillon tiré du tube de la solution mère où il n'y a pas eu de croissance bactérienne visible de la souche <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	73
Figure 28 : photos des deux témoins négatifs (<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876 et <i>S.aureus</i> d'origine clinique) réalisés avec le DMSO	74
Figure 29 : Photographies du test de sensibilité de <i>Staphylococcus aureus</i> et de <i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876d'origine clinique vis-à-vis de la combinaison de 50% de l'HE de la menthe poivrée et 50% de l'HE du cyprès vert	75
Figure 30 : Photographies du test de sensibilité de <i>Staphylococcus aureus</i> et de <i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876d'origine clinique vis-à-vis de la combinaison de 75% de l'HE de la menthe poivrée et 25% de l'HE du cyprès vert	76
Figure 31 : photographies des témoins négatifs des souches fongiques testées pour l'activité antifongique des deux HEs issues de : <i>Mentha x piperita</i> L et <i>Cupressus sempervirens</i> L	79
Figure 32 : photographies des témoins positifs des souches fongiques testées pour l'activité antifongique des deux HEs : <i>Mentha x piperita</i> L et <i>Cupressus sempervirens</i> L	80

Figure 33 : photographies des tests de sensibilités (recto-verso) des souches fongiques vis-à-vis de l'huile essentielle de <i>Mentha x piperita</i> L.....	81
Figure 34 : photographies des tests de sensibilités (recto-verso) des souches fongiques vis-à-vis de l'huile essentielle de <i>Cupressus sempervirens</i> L.....	83
Figure 35 : Représentation graphique des tests de sensibilité des souches fongiques vis-à-vis des deux huiles essentielles testés ; <i>Mentha x piperita</i> L. et <i>Cupressus sempervirens</i> L. ainsi que l'antifongique utilisé	85

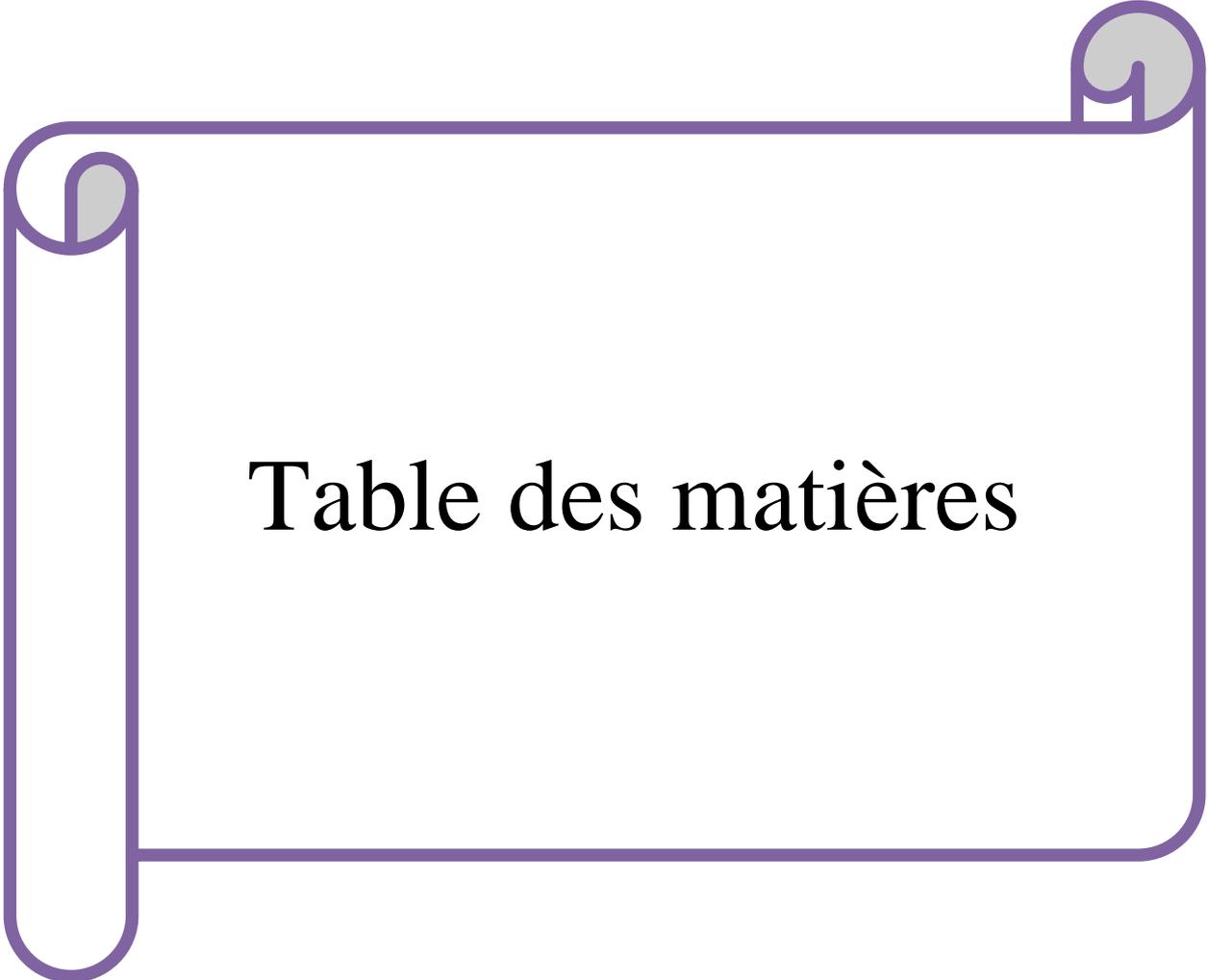


Table des matières

Table des matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Résumé

Introduction	1
--------------------	---

1^{er} partie : synthèse bibliographique

Chapitre I : généralités sur les huiles essentielles

1. Définition des huiles essentielles.....	3
2. Répartition, localisation et rôles des huiles essentielles dans la plante	3
2.1.Répartition et localisation des huiles essentielles dans la plante	3
2.2.Rôles des huiles essentielles dans la plante	5
3. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles	6
4. Composition chimique des huiles essentielles	7
4.1.Les terpénoïdes	7
4.1.1. Les monoterpénoïdes	8
4.1.2. Les sesquiterpènes.....	10
4.2.Les composés aromatiques.....	10
4.3.Les composés d'origines diverses.....	11
5. Procédés d'extraction des huiles essentielles	11
5.1.Technique d'hydrodistillation	12
5.2.Extraction par entraînement à la vapeur d'eau	13
5.3.Technique d'hydrodiffusion.....	13
5.4.Extraction par solvants volatils.....	14
5.5.Extraction par micro-ondes.....	14
5.6.Extraction par les corps gras	15
5.7.Extraction au CO2 supercritique	16
6. Facteurs de variabilité des huiles essentielles	16
7. Toxicité des huiles essentielles	16
8. Conservation des huiles essentielles.....	17

Chapitre II : Activités biologiques des huiles essentielles et domaines d'utilisation

1. Activités biologiques des huiles essentielles.....	18
---	----

1.1. Activité antimicrobienne	18
1.1.1. Activité antibactérienne	18
1.1.2. Activité antifongique	21
1.1.3. Activité antivirale	22
1.2. Activité pesticide	23
1.2.1. Activité insecticide	23
1.2.2. Activité herbicide	24
1.3. Activité anti-inflammatoire	24
1.4. Activité antioxydant	24
1.5. Autres activités	25
2. Domaines d'utilisation des huiles essentielles	25
2.1. Industrie pharmaceutique	25
2.2. Parfumerie et cosmétologie	26
2.3. Industrie agro-alimentaire	26
2.4. Industrie chimique	27

Chapitre III : description de *Cupressus sempervirens* L. et *Mentha x piperita* L.

1. Cyprès (<i>Cupressus sempervirens</i> L.)	28
1.1. Classification botanique	28
1.2. Description botanique	28
1.3. Origine et répartition géographique	29
1.4. utilisation	30
1.5. Huile essentielle du cyprès vert	30
2. Menthe poivrée (<i>Mentha x piperita</i> L.)	31
2.1. Classification botanique	31
2.2. Description botanique	31
2.3. Origine et répartition géographique	32
2.4. Utilisation	32
2.5. Huile essentielle de la menthe poivrée	32

Chapitre IV : la résistance bactérienne aux antibiotiques et moyens de luttés

1. définition de l'antibiorésistance	34
2. types de résistances	34
2.1. résistance naturelle	34

2.2.Résistance acquise.....	35
3. Mécanismes d'échappement à l'action des antibiotiques.....	35
4. mécanismes de résistance	36
4.1.résistance par modification enzymatique	37
4.2.phénomène d'imperméabilité	37
4.3.phénomène d'efflux	38
4.4.défaut d'affinité	40
4.5.autres mécanismes	40
5. moyens de lutte contre l'antibiorésistance.....	41

2^{ème} partie : étude expérimentale

I. Matériel et méthode.....	43
1. Matériel.....	43
1.1. Souches microbiennes testées.....	43
1.2.Milieus de culture utilisés.....	44
1.3.Antibiotiques et antifongique utilisés.....	45
1.4.Les huiles essentielles testées	45
1.5.Emulsifiant utilisé	46
1.6.Appareillage.....	46
2. Méthode	47
2.1.Tests de confirmation microbiologiques des souches bactérienne	47
2.1.1. Revivification des souches dans le milieu BHIB.....	47
2.1.2. Repiquage dans un milieu sélectif	47
2.1.3. Coloration de GRAM	47
2.2.Etude de l'activité antibactérienne des deux huiles essentielles	48
2.2.1. Préparation des pré-cultures	48
2.2.2. Préparation et standardisation de l'inoculum	49
2.2.3. Evaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion sur gélose	49
2.2.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	51
2.2.5. Détermination de la nature de l'activité des huiles essentielles (CMB)	52
2.3.Etude de l'effet de la combinaison des deux huiles essentielles.....	52

2.3.1. Test de sensibilité de deux souches bactériennes vis-à-vis de la combinaison des deux huiles avec une proportion de : 50% de l'HE de menthe poivrée + 50% de l'HE du cyprès	52
2.3.2. Test de sensibilité de deux souches bactériennes vis-à-vis de la combinaison des deux huiles avec une proportion de : 75% de l'HE de menthe poivrée + 25% de l'HE du cyprès (75%-25%).....	53
2.4. Etude de l'activité antifongique des deux huiles essentielles.....	54
2.4.1. La pureté de la souche	54
2.4.2. Préparation de la suspension fongique	54
2.4.3. Activité antifongique des huiles essentielles	55
II. Résultats et discussion.....	56
1. Résultats des tests de vérification des souches bactériennes	56
2. Résultats des témoins réalisés par la méthode de diffusion sur gélose	57
2.1. Résultats des témoins négatifs réalisés avec le DMSO	57
2.2. Résultats des témoins positifs (antibiogramme)	58
3. Résultats du test de sensibilité des souches bactériennes aux deux huiles essentielles.....	61
3.1. Résultats du test de sensibilité des souches bactériennes à l'H.E de <i>Mentha x piperita</i> L.....	61
3.2. Résultats du test de sensibilité des souches bactériennes à l'H.E de <i>Cupressus sempervirens</i> L.....	63
4. Concentrations minimales inhibitrices (CMI)	70
4.1. Résultats de la mesure des CMI de <i>Mentha x piperita</i> L.....	70
4.2. Résultats des CMI de <i>Cupressus sempervirens</i> L.....	72
5. Résultats de la nature de l'activité des deux huiles essentielles (CMB).....	71
5.1. Résultats des CMB de <i>Mentha x piperita</i> L.....	71
5.2. Résultats des CMB de <i>Cupressus sempervirens</i> L.....	73
6. Résultats de la combinaison des deux huiles essentielles	74
6.1. Résultats des témoins négatifs réalisés avec le DMSO	74
6.2. Résultats de la combinaison de l'H.E de <i>Mentha x piperita</i> L. (50%) et <i>Cupressus sempervirens</i> L. (50%).....	75

6.3.Résultats de la combinaison de l'HE de <i>Mentha x piperita</i> L. (75%) et <i>Cupressus sempervirens</i> L. (25%).....	75
7. Activité antifongique des deux huiles essentielles.....	78
7.1.Confirmation de la pureté de la souche fongique « <i>Aspergillus niger</i> », étude macroscopique et microscopique.....	78
7.2.Résultats des témoins réalisés par la méthode de diffusion sur gélose	79
7.2.1. Résultats des témoins négatifs réalisés avec le DMSO	79
7.2.2. Résultats des témoins positifs réalisés avec l'antifongique	80
7.3. Sensibilité des deux souches fongiques vis-à-vis des deux huiles essentielles	81
7.3.1. Sensibilité des deux souches fongiques vis-à-vis de l'HE de <i>Mentha x piperita</i> L.	81
7.3.2. Sensibilité des deux souches fongiques vis-à-vis de l'HE <i>Cupressus sempervirens</i> L.....	83
Conclusion et perspectives	89
Références bibliographiques	
Annexes	

Résumé

La résistance microbienne aux antibiotiques est aujourd'hui considérée comme étant une menace pour la santé de l'homme et l'animal, donc des moyens de lutte doivent être trouvés pour y remédier. Parmi lesquels on peut citer les plantes médicinales aromatiques, qui possèdent un large arsenal de métabolites secondaires dotés de diverses activités biologiques redoutable. Dans ce contexte les huiles essentielles sont de bons agents antimicrobiens dont l'activité a été démontrée *in vitro* par plusieurs études, pour ce notre étude est basée sur l'évaluation de l'activité antibactérienne et antifongique de deux huiles essentielles : *Mentha x piperita* L. et *Cupressus sempervirens* L.

L'étude de l'activité antibactérienne a révélé que l'huile essentielle de *Mentha x piperita* L. possède une meilleure activité que celle de *Cupressus sempervirens* L. sur les souches d'origine clinique : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *klebsiella pneumoniae* et *Acinetobacter baumannii* avec des diamètres d'inhibition de 25,5mm, 13mm, 13,5mm et 12mm respectivement, ainsi que sur la souche référenciée *Bacillus cereus* ATCC 10876 avec un diamètre de 20mm. Par contre la combinaison des deux huiles essentielles n'a montré aucune synergie. Les résultats de l'activité antifongique ont révélés que l'HE de *Cupressus sempervirens* L. possède un pouvoir antifongique important contre *Aspergillus niger* et *Candida albicans* avec des diamètres d'inhibition de 21mm et 17,5mm respectivement. Quant à l'HE de *Mentha x piperita* L., elle possède une activité importante contre *Candida albicans* avec un diamètre de 25,5mm. De ce fait ces deux huiles essentielles sont considérées comme étant de bons agents antimicrobiens.

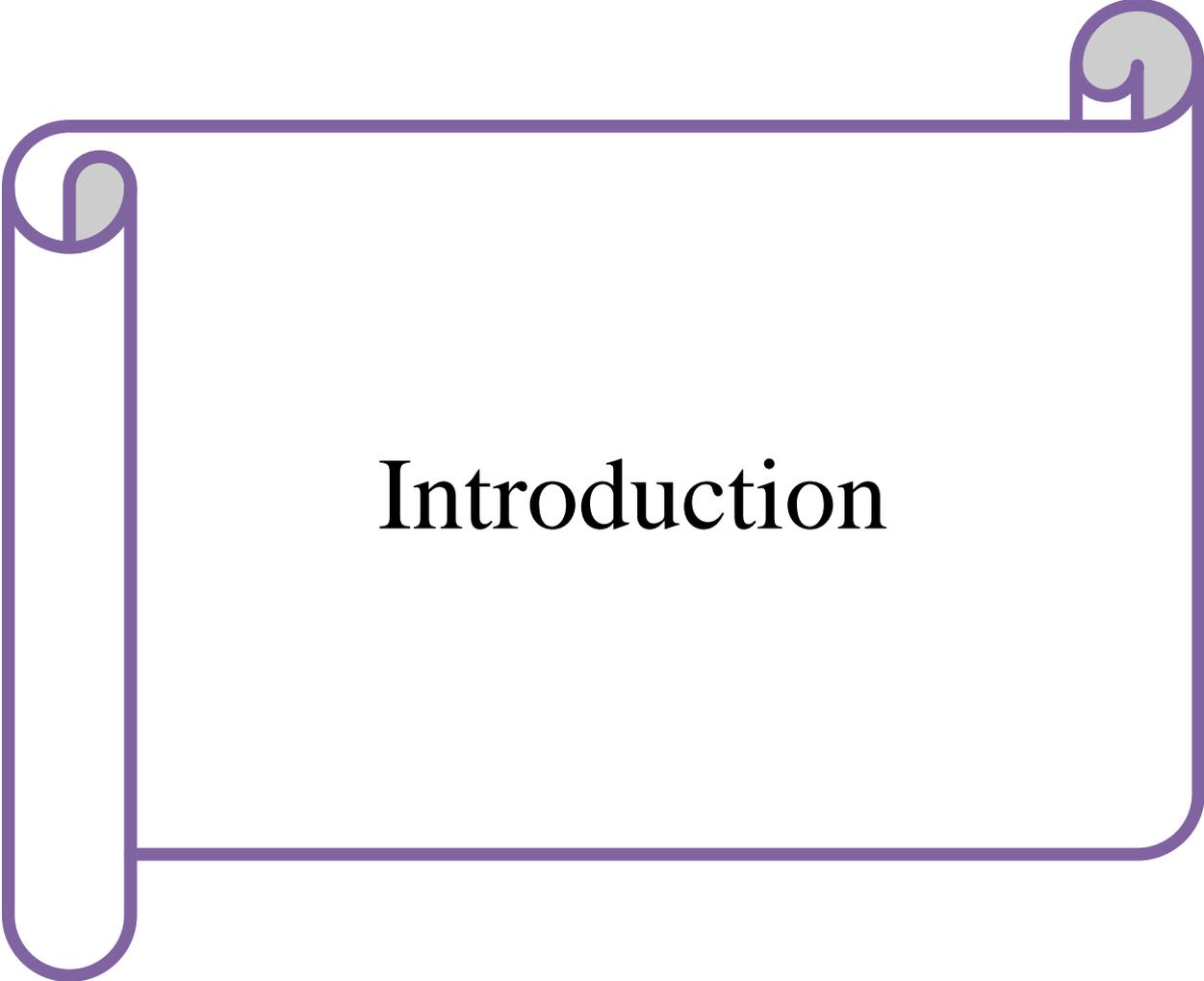
Mots clés : huiles essentielles, activité antibactérienne, activité antifongique, antibiorésistance, *Mentha x piperita* L., *Cupressus sempervirens* L.

Abstract

Microbial resistance to antibiotics is now considered as a threat to human and animal health, the rapid evolution of this resistance is prompting researchers to find ways of fighting to remedy this. Among these means, aromatic medicinal plants are candidates of choice because they possess a wide arsenal of secondary metabolites endowed with various significant biological activities. In this context, essential oils are good antimicrobial agents whose activity has been demonstrated *in vitro* by several studies, for which our study is based on the evaluation of the antibacterial and antifungal activity of two essential oils : *Mentha x piperita* L. and *Cupressus sempervirens* L.

The study of antibacterial activity revealed that the essential oil of *Mentha x piperita* L. showed better activity than *Cupressus sempervirens* L. on strains of clinical origin: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* with inhibition diameters of 25.5mm, 13mm, 13.5mm and 12mm respectively, as well as the reference strain *Bacillus cereus* ATCC 10876 with a diameter of 20mm. On the other hand, the combination of the two essential oils showed no synergy. The results of the antifungal activity revealed that the HE of *Cupressus semprevirens* L. possesses an important antifungal potency against *Aspergillus niger* and *Candida albicans* with inhibition diameters of 21mm and 17.5mm respectively. As for the *Mentha x piperita* L. EO has an important activity against *Candida albicans* with a diameter of 25,5mm. As a result, these two essential oils are considered to be good antimicrobial agents.

Key words: essential oils, antibacterial activity, antifungal activity, antimicrobial resistance, *Mentha x piperita* L., *Cupressus sempervirens* L.



Introduction

Introduction

La résistance microbienne aux antibiotiques et antifongiques constitue aujourd'hui l'une des plus grandes menaces pesant sur la santé mondiale, la sécurité alimentaire et le développement. Ces micro-organismes résistants peuvent être mortels surtout en cas de déficience du système immunitaire.

La montée de l'antibiorésistance est principalement due à la prescription immodérée et souvent inappropriée d'antibiotiques. Administrés à titre curatif ou préventif, les antibiotiques favorisent l'élimination des bactéries sensibles et la sélection des plus résistantes (MADEC, 2013 ; EL AMIR *et al.*, 2014). Mais il faut savoir que cette résistance est un phénomène naturelle qui est accéléré par le mauvais usage des médicaments chez l'homme et l'animal car avec les antibiotiques on a refait ce que la nature a fait il y a des milliards d'années et qui a conduit à l'évolution des espèces.

Parallèlement à cette augmentation mondiale de la résistance, on assiste depuis plusieurs décennies à une réduction drastique du nombre de nouveaux antibiotiques disponibles, en particulier des antibiotiques de nouvelle classe, ou avec un nouveau mécanisme d'action (CARLET, 2016).

A côté de l'antibiorésistance un autre problème s'installe, il s'agit de l'augmentation de l'incidence des infections dermatophytiques. Les dermatophytes sont responsables des mycoses superficielles ou profondes, qui sont parfois graves. Bien que les mesures de contrôle soient disponibles, elles ont une efficacité limitée. Les agents antifongiques classiques tels que les dérivés de chlorhexidine et d'imidazole ont des utilisations limitées ; en raison de leur effets secondaires tels que l'hépatotoxicité, la nausée et la diarrhée (DEVI *et al.*, 2013).

Pour lutter donc contre ce phénomène de résistance, les antimicrobiens d'origine végétale ont suscité une attention particulière car depuis plusieurs années, les plantes ont été considérées comme étant un réservoir de métabolites secondaires diversifiés qui possèdent un large éventail d'activités biologiques, ces derniers ont été utilisées en particulier dans la conservation des aliments, produits pharmaceutiques, médicaments alternatifs et thérapies naturelles (IMELOUANE *et al.*, 2009 ; BARBOSA, 2010).

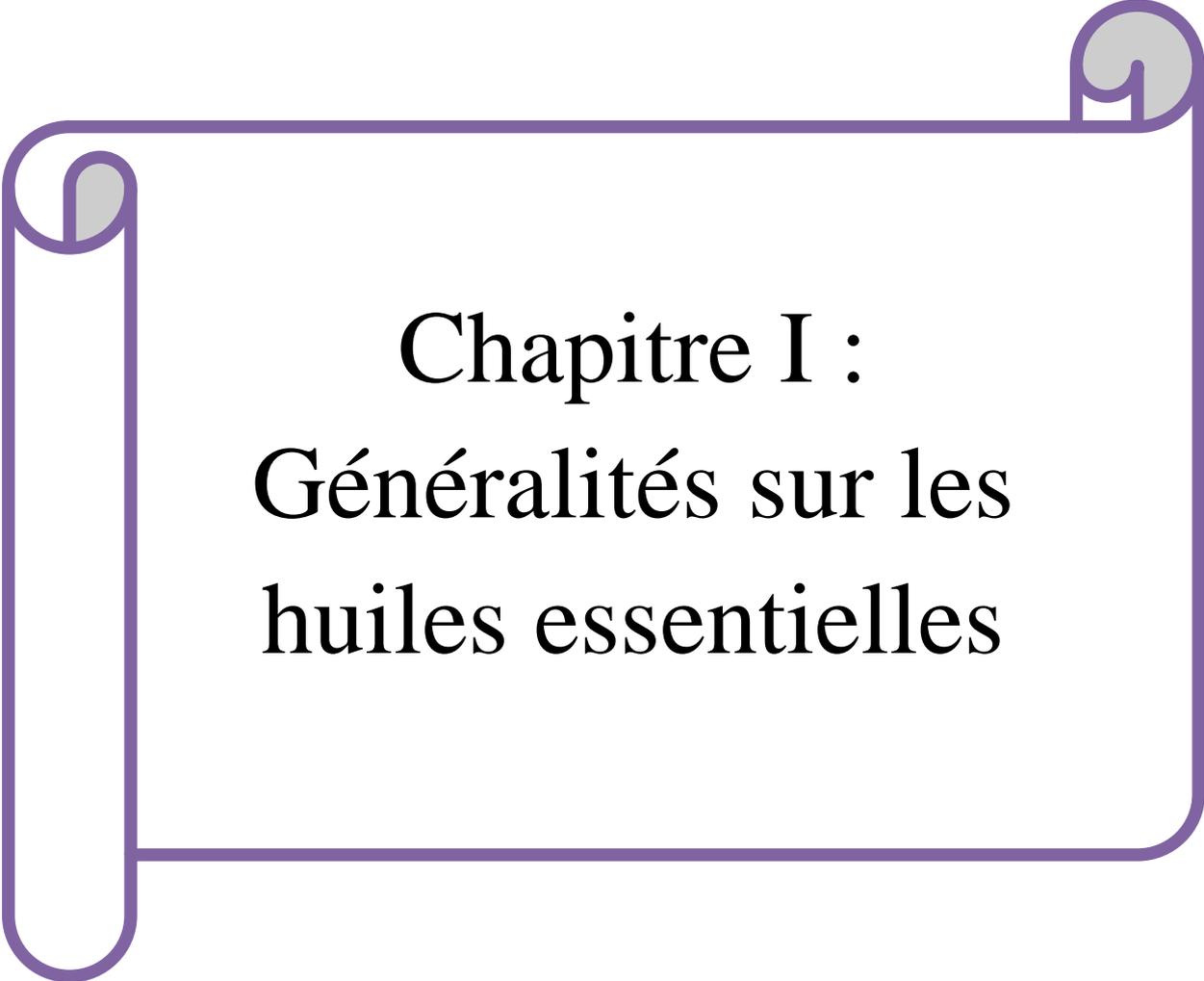
Introduction

Dans ce contexte, les huiles essentielles pourraient être un choix intéressant contre ces agents pathogènes résistants; les propriétés antiseptiques des huiles essentielles sont été démontrées, au moins *in vitro* (plus de 2000 publications sur l'activité antimicrobienne ont été publiés dans PubMed depuis 2002) (SFEIR *et al.*, 2013).

Les huiles essentielles sont des métabolites secondaires extraites à partir des plantes par divers procédés, elles sont produites par ces dernières en temps que moyen de défense contre les ravageurs phytophage. Leurs extraits contiennent en moyenne 20 à 60 composés dont la plupart sont des molécules peu complexes, soit des monoterpènes ou des terpènes plus complexes, dont les sesquiterpenes.

Les nombreuses études réalisées sur les huiles essentielles ont démontrées que ces dernières avaient une activité antimicrobienne assez importante contre plusieurs souches bactériennes et fongiques, et donc une certaine importance dans le développement de nouveaux médicaments dont le principe actif est naturel, et qui sont plus efficaces et plus respectueux de la santé.

Pour cela notre travail s'est basé sur l'évaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne et antifongique de deux huiles essentielles provenant de deux plantes : une appartenant à la famille des Lamiaceae il s'agit de la menthe poivrée (*Mentha x piperita* L.) et une autre provenant de la famille des Cupressaceae ; le cyprès vert (*Cupressus sempervirens*L.) contre des souches bactériennes pathogènes et référenciées ainsi que deux souches fongiques.



Chapitre I :
Généralités sur les
huiles essentielles

1. Définition des Huiles essentielles

Les huiles essentielles (HEs) sont des métabolites secondaires produits par les plantes comme moyen de défense contre les ravageurs phytophages. Leurs extraits contiennent en moyenne 20 à 60 composés dont la plupart sont des molécules peu complexes, soit des monoterpènes avec leurs phénols reliés, et des terpènes plus complexes, dont les sesquiterpènes (CHIASSON et BELOIN, 2007).

Selon SHIRNER (2004), les HEs sont des huiles très volatiles qui recèlent des substances odoriférantes sous forme de très petites gouttelettes d'huile stockées dans diverses parties de la plante (les fleurs, les tiges, les graines, le bois ou les racines) et qui sont soustraite de cette dernière par divers procédés à fin de les rendre accessible à l'homme. Chaque huile possède sa propre personnalité aromatique, son caractère et son énergie subtile.

Mais la définition qui semble la plus universellement acceptée est la suivante « huile obtenue suite à l'extraction de la matière végétale à la vapeur d'eau ». Cette huile est composée d'un mélange des substances volatiles obtenues par co-distillation avec la vapeur d'eau. Celle-ci libère des substances renfermées dans les glandes de la plante, à des températures plus basses que leur propre point d'ébullition grâce à la contribution de la pression partielle de la vapeur d'eau (GARNEAU, 2004).

1. Répartition, localisation et rôles des huiles essentielles dans la plante

2.1. Répartition et localisation des huiles essentielles dans la plante

Selon BRUNETON (1999), les HEs n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs tels que : les Myrtaceae, Lauraceae, Rutaceae, Lamiaceae, Asteraceae, Cupressaceae, Poaceae, Zingiberaceae, Piperaceae ; car ce sont ces derniers qui sont capable d'élaborer les constituants des HEs.

Ces dernières peuvent être stockées dans tous les organes des végétaux aussi bien les fleurs (bergamotier, tubéreuse), les feuilles (eucalyptus, citronnelle), mais on peut également les retrouver dans les écorces (cannelier), et aussi au niveau des bois (bois de rose), des

racines (vétiver), des rhizomes (curcuma, gingembre), des fruits (anis, badiane), et des graines (muscade). (BRUNETON, 1999 ; SANGWAN *et al.*, 2001 ; BAKKALI *et al.*, 2008). Il faut noter que malgré qu'une HE peut se localiser au niveau de tous les organes d'un végétal sa composition peut varier selon sa localisation (BRUNETON, 1999).

D'après GUIGNARD *et al.* (1985), il n'existe pas de règles générale concernant le lieu d'accumulation des HEs dans le végétal, par contre pour GUARNEAU (2004), la plus part des HEs se retrouvent dans des structures glandulaires et des cellules sécrétrices qui peuvent se retrouver aussi bien dans les organes reproducteurs que végétatifs du végétal.

Quant à la synthèse et l'accumulation des HEs, elle peut être assurée par : des cellules sécrétrices (les cellules à HE des Lauraceae), des cellules épidermiques, des poils sécréteurs (les poils sécréteurs des Lamiaceae), des canaux sécréteurs (Apiaceae), ou des poches sécrétrices (Myrtaceae), et aussi des cavités (figure 2) ou des trichomes glandulaires (figure 1) (BRUNETON, 1999 ; BAKKALI *et al.*, 2008).

Le tableau suivant illustre la localisation de certaines HE dans les plantes.

Tableau I : Les parties de certaines plantes riches en huiles essentielles (GARNEAU, 2004).

Partie de plante	Exemple
Feuilles	Romarin, sauge
Feuilles de conifères	Sapin, cèdre
Tiges	Citronnelle, lemongrass
Écorces	Cannelier
Racines	Angelica, vétiver
Rhizomes	Acorus, gingembre
Bulbes	Oignon
Bois	Santal
Fruits	Bleuet, citron
Fleurs	Jasmin, rose
Graines	Aneth

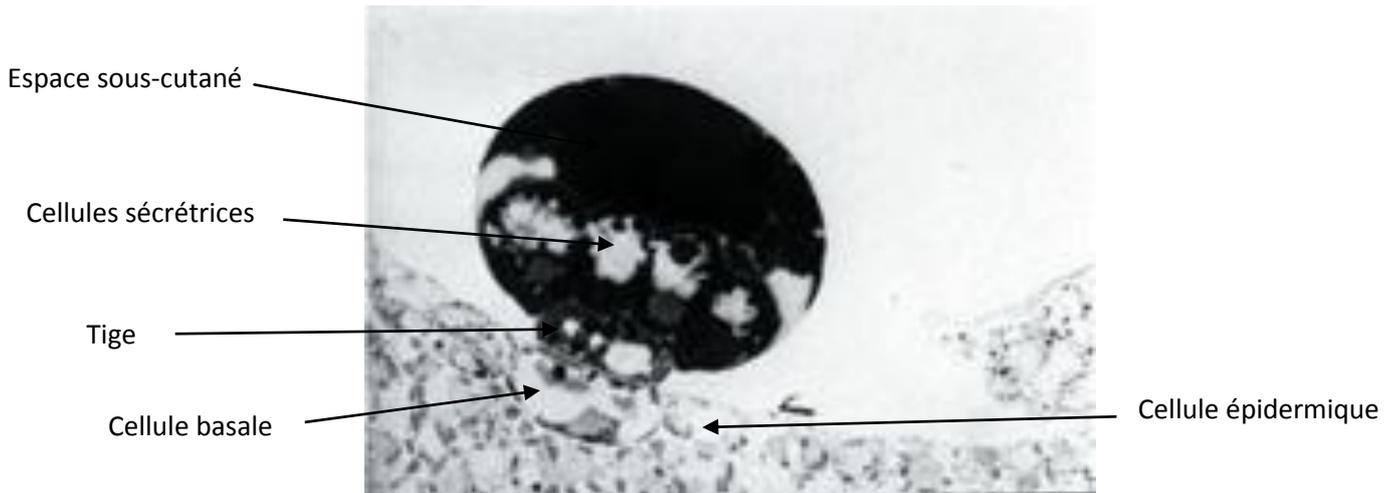


Figure 1: Trichome glandulaire de la menthe verte (coupe longitudinale) vue sous microscope optique (CROTEAU *et al.*, 2000).

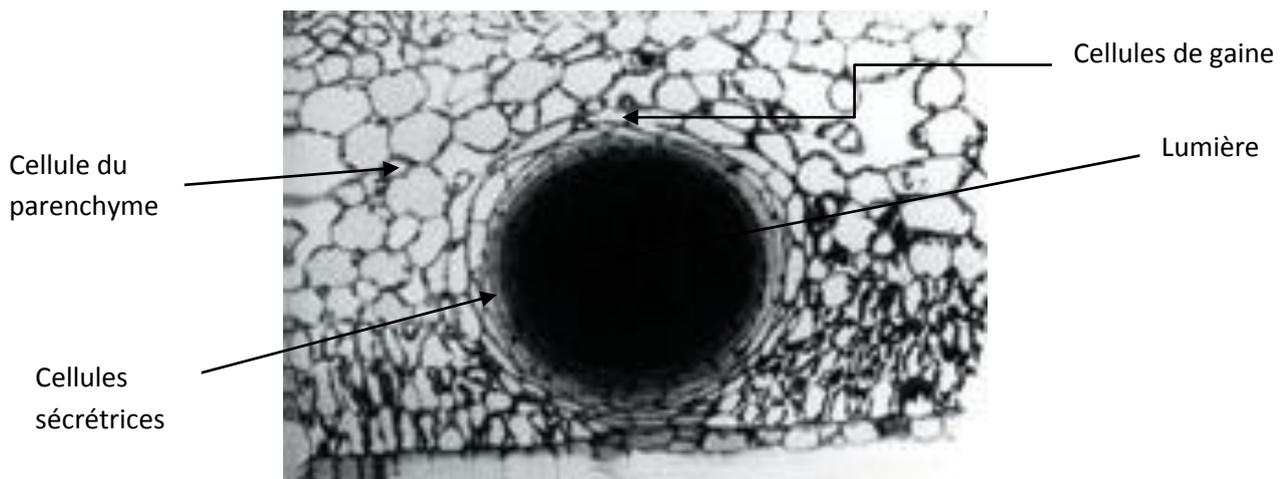


Figure 2 : Cavité de sécrétion dans une feuille de citron vue sous sa coupe transversale sous microscope optique (CROTEAU *et al.*, 2000).

2.2. Rôles des huiles essentielles dans la plante

Les HEs sont des produits du métabolisme secondaire de la plante de ce fait ils n'ont aucun rôle fondamental dans le développement de la plante, ce qui est aussi le cas des di, tri et tétraterpènes ; ainsi leur fonction biologique dans la plante demeure le plus souvent méconnue, mais cela dit diverses expérimentations ont démontrées que les mono et

sesquiterpènes ont un rôle dans les interactions végétal-végétal et végétal-animal (BRUNETON, 1993 ; CROTEAU *et al.*, 2000).

Selon BRUNETON (1999) ; les HEs peuvent être considérées comme des messagers chimiques utilisées par les plantes aromatiques pour interagir avec leur environnement, et ce en tant que protecteur des plantes en éloignant les maladies et les parasites car ils sont considérés comme des agents antimicrobiens, antifongiques, antiviraux, insecticides et protègent également les plantes contre les herbivores en réduisant leur appétit pour de telles plantes, elles sont aussi considérées comme des agents allélopathiques (inhibiteurs de germination notamment) . Elles interviennent aussi dans la pollinisation en attirant certains insectes favorisant ainsi la dispersion du pollen et des graines (BAKKALI *et al.*, 2008).

Les HEs jouent également le rôle de mobilisateur d'énergie lumineuse et de régulateur, au profit de la plante (CROTEAU *et al.*, 2000), par exemples : chez les plantes désertiques les HEs permettent de maintenir l'humidité indispensable à leur vie, et cela en saturant l'air autour de la plante par des vapeurs aromatiques, elles empêchent ainsi une hausse de température pendant la journée et une baisse brutale pendant la nuit (BELAICH, 1979).

Les HEs peuvent également être considérées comme une source d'énergie : «mis en réserve pendant le jour, elles seraient dégradés durant la nuit en acétyl-CoA» (GUIGNARD *et al.*, 1985).

3. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles ont un certain nombre de propriétés physico-chimique communes malgré la différence dans leur composition et ces propriétés peuvent être résumées comme suit : les HEs sont généralement incolores, mais cela dit elles possèdent une teinte jaune pâle lorsqu'elles viennent d'être préparées et certaines peuvent être colorées par exemple : l'HE de matricaire a une coloration bleu sombre (contient les azulènes), une coloration rougeâtre pour l'huile essentielle de cannelle.

Elles sont liquide à température ambiante (ordinaire) et certaines d'entre elles cristallisent à basse température (HE d'anis), elles sont volatile et entraînable à la vapeur d'eau, leur densité est inférieur à celle de l'eau (inférieur à 1) sauf quelques exceptions (HE

de la cannelle ou girofle), elles sont sensible à l'oxydation donc leur conservation est limitée (BRUNETON, 1999 ; CATIER et ROUX, 2007 ; COUIC-MARINIER et LOBSTEIN, 2013).

La plus part des HEs dérivent la lumières polarisée et ont un indice de réfraction élevé, elles sont liposolubles et solubles dans les solvants organiques usuelles, très peut soluble dans l'eau mais le sont suffisamment pour lui communiquer leur odeur on parle alors d'une « eau distillée florale » (BRUNETON, 1999).

4. Composition chimique des huiles essentielles

La composition chimique des HEs est complexe ; car elles sont constitués d'un mélange de composés qui appartiennent principalement à deux grands groupes chimiques caractérisés par des origines biogénétiques distinctes qui sont : le groupe des terpénoïdes (prédominants) et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane (beaucoup moins fréquents). Mais elles peuvent aussi contenir en plus des constituants non volatils issus de processus de dégradation (BRUNETON, 1999 ; SANGWAN *et al.*, 2001 ; CATIER et ROUX, 2007).

Plusieurs études reportent que l'analyse de la composition chimique des HEs se fait par chromatographie en phase gazeuse (CPG ou GC) ; et ce pour l'analyse quantitative, et par chromatographie phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS) ; pour l'analyse qualitative, cette analyse peut également être réalisée par la technique de résonance magnétique nucléaire (RMN) (BISSANGOU et OUAMBA, 1997 ; ALITONOU *et al.*, 2004 ; BURT, 2004 ; TOMI *et al.*, 2011 ; BOUKSSAIM *et al.*, 2013).

4.1. Les terpénoïdes

Les terpènes constituent une famille de composés qui sont vraisemblablement les composés naturels des végétaux les plus variés structurellement, le terme terpénoïdes ou terpène dérive du fait que ces composés ont été extrait pour la toute première fois de la térébenthine ("terpentin" en allemand) (CROUTEAU *et al.*, 2000).

Les terpénoïdes sont synthétisés à partir de cinq unités de carbone du pyrophosphate d'isopentényle (IPP) et son isomère, le pyrophosphate de diméthylallyle (β,β -diméthylallyle) qui sont tous deux issus de l'acide mévalonique, leur combinaison donne le pyrophosphate de géranyle (GPP) qui se transforme en géraniol et autres monoterpènes. La synthèse des autres

terpènes s'effectue à la suite de condensations d'autres unités d'IPP, ce qui est montré par la figure 3 (BURT, 2004 ; GARNEAU, 2004).

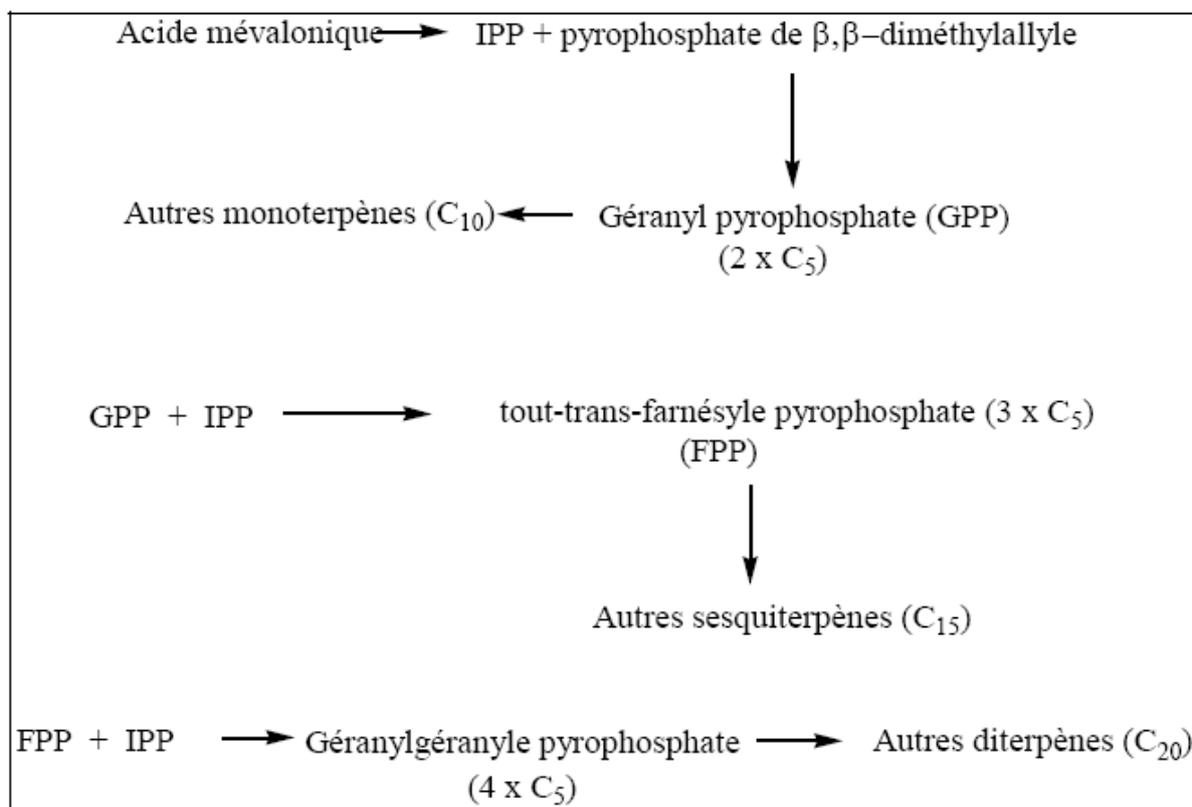


Figure 3 : Biosynthèse des terpènes (GARNEAU, 2004).

Selon SVOBODA *et al.* (2000) ainsi que COUIC-MARINIER et LOBSTEIN (2013), les terpènes ont une structure cyclique ou linéaire et répondent généralement à la formule générale $(C_5H_8)_n$. Suivant le nombre d'unités isopréniques on a les hémiterpènes, monoterpènes, sesquiterpènes...

Les terpènes qui sont rencontrés dans les HEs sont les terpènes les plus volatiles c.-à-d. ceux dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée, il s'agit des mono- et sesquiterpènes (BRUNETON, 1999).

4.1.1. Les monoterpènes

Les monoterpènes en C10 sont constitués de deux unités isoprène, ils sont parfois majoritaire dans l'HE par exemple ils constituent 90% de l'HE de *Citrus*. Ils peuvent être classés selon leur structure en : composés acycliques (myrcène, ocimènes), monocycliques

(α - et γ -terpinène, p-cymène) ou bicyclique (pinènes, Δ^3 - carène, camphène, sabinène), ou bien selon leur fonction en : alcools (géraniol, linalol), aldéhyde (géraniol, néral), cétones, esters, éthers, peroxydes, phénols (BRUNETON, 1999 ; BAKKALI *et al.*, 2008)

Ils sont surtout présents chez les conifères et sont considérés comme étant des agents anti-infectieux (bactéricides, fongicides et virucides), ainsi que d'excellents immunostimulants et de bon antalgiques à action percutané (COUIC-MARINIER et LOBSTEIN, 2013).

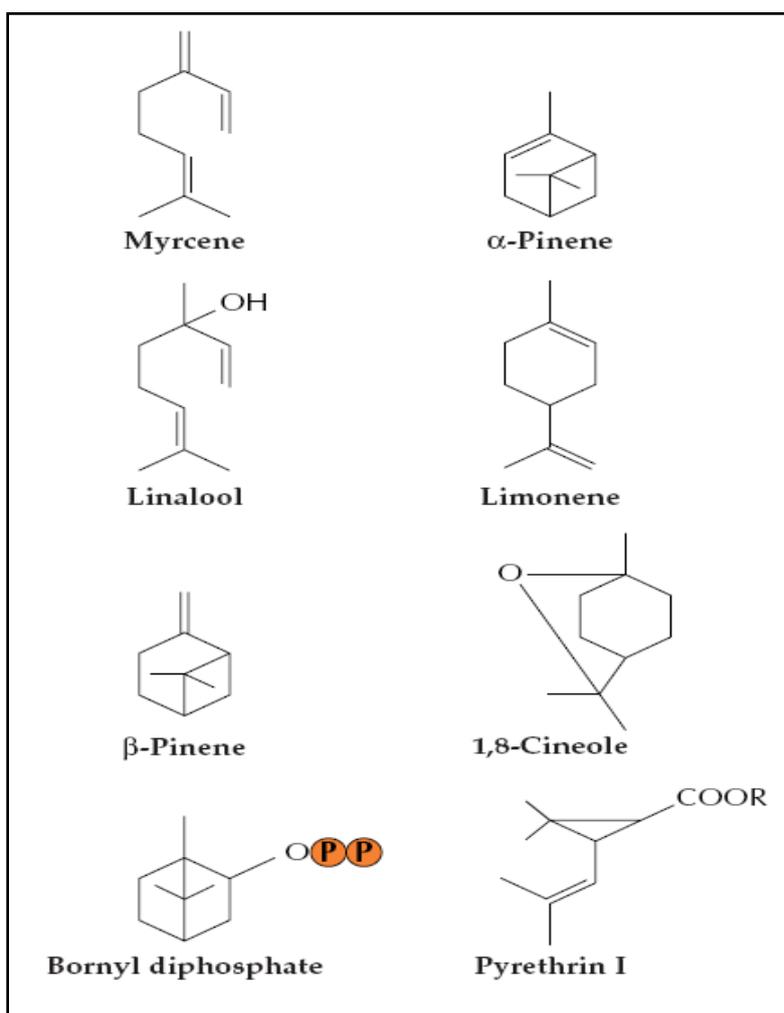


Figure 4 : Structures de monoterpènes, incluant des composés insecticides (α - et β -pinene pyrethrin), des pollinisateurs (linalool et 1,8-cineole), et des agents anti-herbivores (1,8-cineole) (CROUTEAU *et al.*, 2000).

4.1.2. Les sesquiterpènes

Les sesquiterpènes en C15 comportent trois unités d'isoprènes, il faut noter que les variations structurales dans cette classe de terpènes sont de même nature que chez les monoterpènes (alcools, cétones...) mais le nombre de cyclisation possible augmente d'où l'existence d'une très grande variété de structures connues.

Exemples de certains sesquiterpènes : carbures mono ou polycycliques (β -bisabolène, longifolène), alcools (farnésol, β -santalol), ester (acétate de cédryle) (BRUNETON, 1999).

Ils sont légèrement hypotenseurs, calmants et anti-inflammatoires mais peuvent être néphrotoxiques (COUIC-MARINIER et LOBSTEIN, 2013).

4.2. Les composés aromatiques

Les composés aromatiques dérivés du phénylpropane sont beaucoup moins fréquents que les terpénoïdes mais malgré cela ils fournissent une saveur et odeur significative et indispensable à l'huile essentielle. Se sont généralement des allyl- et propénylphénol, et parfois des aldéhydes, on peut également retrouver des lactones dérivées des acides cinnamiques (entraînables par la vapeur d'eau et ainsi présentes dans certaines huiles essentielles), la valinine... (BRUNETON, 1999 ; SANGWAN *et al.*, 2001 ; COUIC-MARINIER et LOBSTEIN, 2013).

Exemples de certain composés aromatiques : l'acide cinnamique et l'aldéhyde cinnamique (HE de cannelle), l'eugénol (HE de girofle), l'anéthole et l'aldéhyde anisique (HE de badiane, d'anis, de fenouil), le safrole (HE de saffras), les coumarines (HE de céleri) (COUIC-MARINIER et LOBSTEIN, 2013).

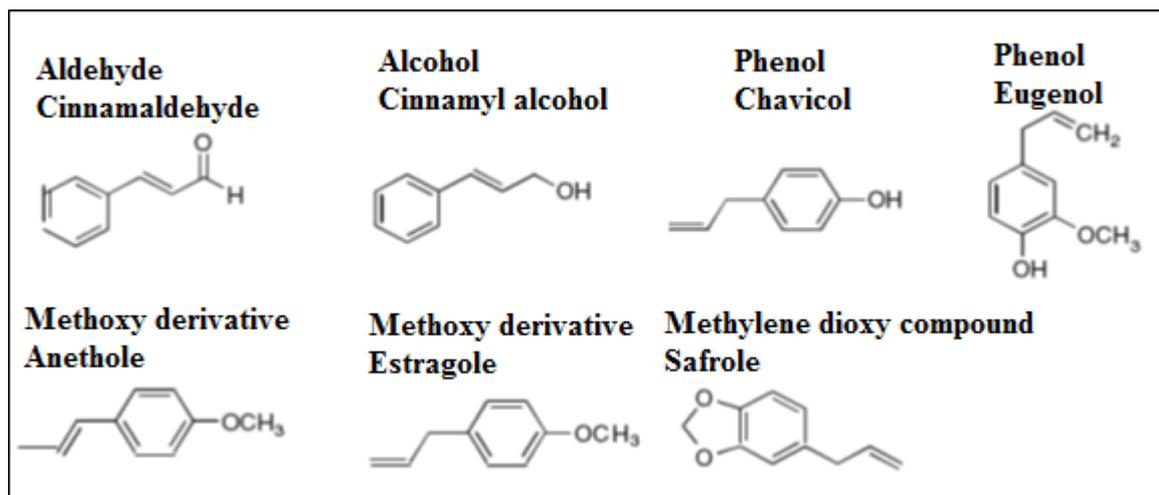


Figure 5 : Structure chimique de certains composés aromatiques (BAKKALI *et al.*, 2008).

4.3. Composés d'origine diverse

Ce sont des composés qui résultent de la transformation de molécules non volatiles et qui contribuent aux arômes des fruits. Il y a d'une part, des composés qui peuvent être issus de la dégradation des acides gras comme les méthyl-cétones qui proviennent de la β -oxydation, et des composés qui sont issus de la dégradation des terpènes comme les C_{13} -norisoprénoïdes provenant de l'oxydation des carotènes. D'une autre part, il y a des composés azotés ou soufrés qui sont plutôt rare dans les huiles essentielles. On peut également retrouver des produits de masse moléculaire plus importante non entrainable à la vapeur d'eau mais extractible par des solvants comme les homologues des phénylpropanes, les diterpènes... (BRUNETON, 1999).

5. Procédés d'extraction des huiles essentielles

On dénombre plusieurs méthodes d'extraction des HEs, le choix du procédé d'extraction se fait en fonction de la nature de la matière végétale, des caractéristiques physico-chimiques des extraits et de l'usage de ces derniers.

Les étapes d'extraction des HEs restent les mêmes quel que soit le type végétale dont elles sont extraites (LUCCHESI, 2005).

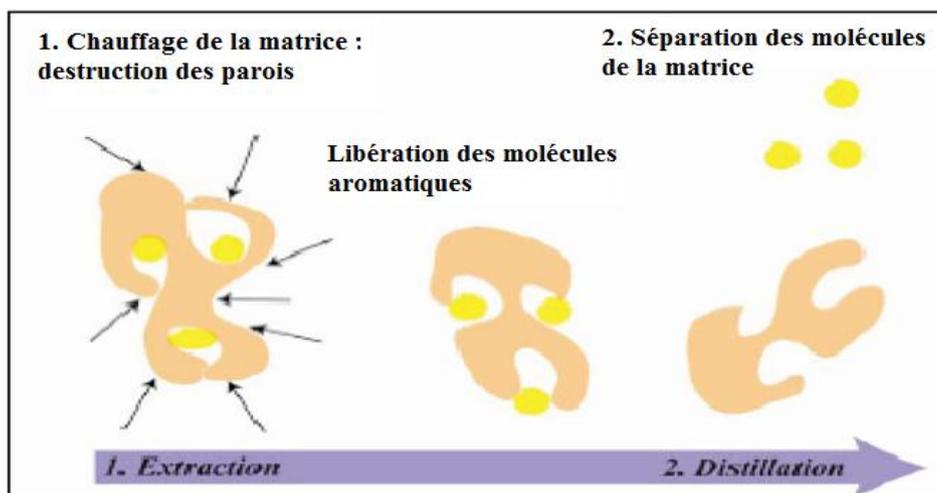


Figure 6 : Schéma représentant l'extraction des huiles essentielles (LUCCHESI, 2005).

5.1. Technique d'hydrodistillation

La technique d'hydrodistillation est le procédé le plus couramment employé pour l'extraction des HES. Elle est considérée comme étant la plus simple et la plus anciennement utilisée (figure 7) (BRUNETON, 1999 ; LUCCHESI, 2005).

Selon BRUNETON (1999), cette technique consiste à mettre directement le matériel végétal à traiter qu'il soit intact ou broyé (turbo-distillation) dans un alambic (ballon) rempli d'eau qui est par la suite porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes qui en résultent sont condensées sur une surface froide (réfrigérant) et l'huile essentielle se sépare de l'hydrolat par simple différence de densité.

L'huile essentielle étant plus légère que l'eau (sauf quelques rares exceptions), elle surnage au-dessus de l'hydrolat

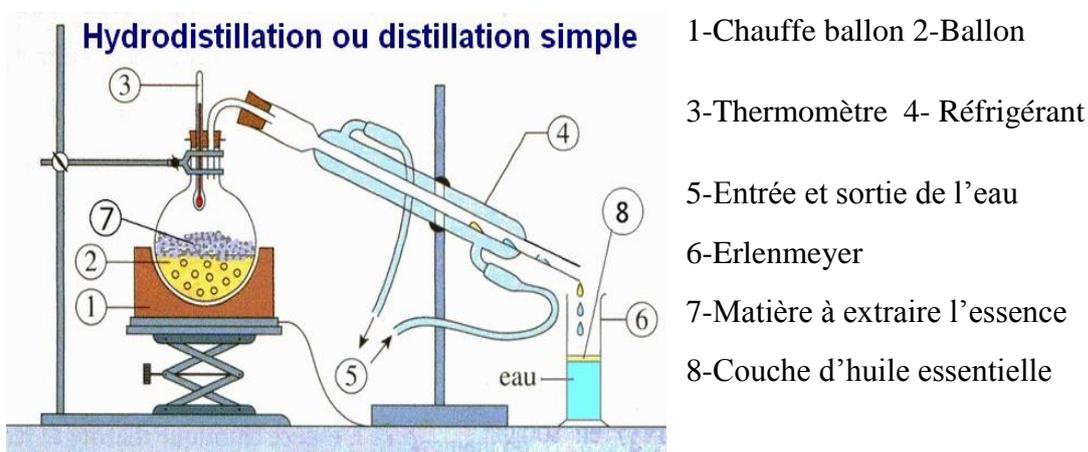


Figure 7: Schéma du principe de la technique d'hydrodistillation (LUCCHESI, 2005).

5.2.Extraction par entrainement à la vapeur d'eau (steam distillation)

Cette technique ne met pas directement en contact l'eau et la matière végétale, contrairement à la technique d'extraction par hydrodistillation.

Elle consiste en une chaudière qui fournit de la vapeur d'eau, en dessus de la chaudière se trouve une grille où est déposée la matière végétale la vapeur d'eau traverse la matière végétale faisant éclater les cellules végétales, libérant ainsi l'HE qui est vaporisée sous forme d'un mélange d'eau et d'HE.

Le mélange passe alors par un condenseur et un essencier, pour ensuite être séparé en une phase organique (qui est l'HE) et une phase aqueuse (Figure 8) (LUCCHESI, 2005).

5.3. Technique d'hydrodiffusion

Dans le cas de l'hydrodiffusion qui est une variante de l'entraînement à la vapeur d'eau, le flux de vapeur est descendant et pas ascendant, la durée de distillation est plus réduite et donc moins dommageable pour les composés volatils, ce qui permet en plus une économie d'énergie, ainsi qu'une réduction de consommation de la vapeur de ce fait cette technique convient parfaitement aux bois ou aux matériaux fibreux, car la vapeur peut s'y infiltrer (LUCCHESI, 2005 ; LARDY et HABERKORN, 2007).

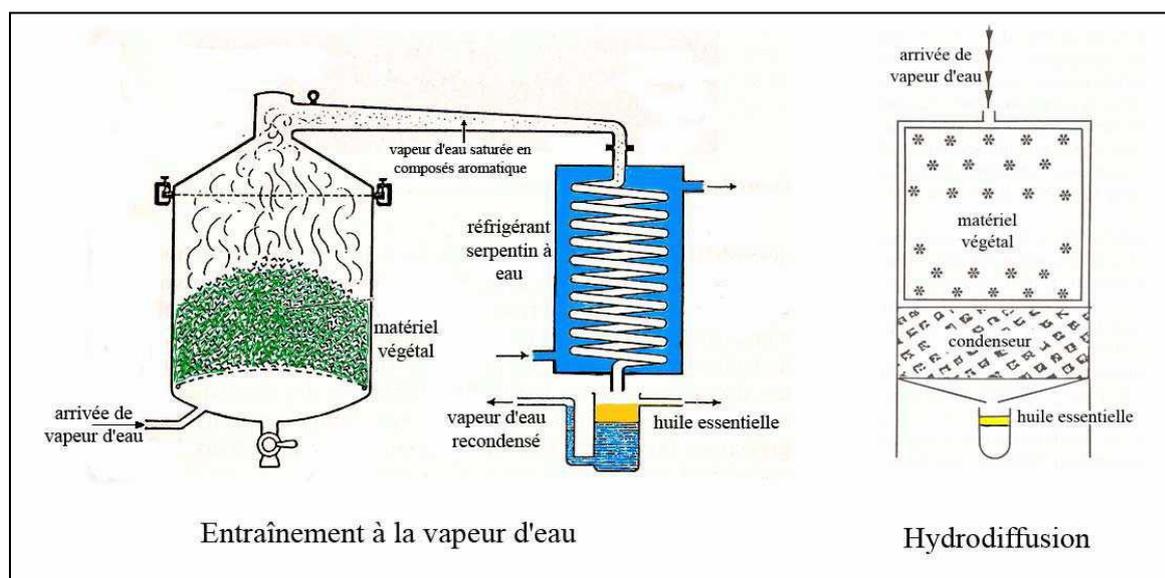


Figure 8 : Entraînement à la vapeur d'eau ascendante et descendante (LUCCHESI, 2005).

5.4.Extraction par solvants volatils

D'après BRIAN (1995), cette extraction est basée sur le fait que les essences aromatiques sont solubles, l'extraction se fait dans des extracteurs de construction continue, semi continue, ou discontinue.

Le matériel végétal sera épuisé par un solvant à bas point d'ébullition, puis éliminé par distillation sous une pression réduite, L'évaporation du solvant donne un mélange odorant de consistance pâteuse, dont l'huile est alors extraite par de l'alcool. Cependant l'extraction par les solvants reste une méthode très coûteuse, et manque de sélectivité.

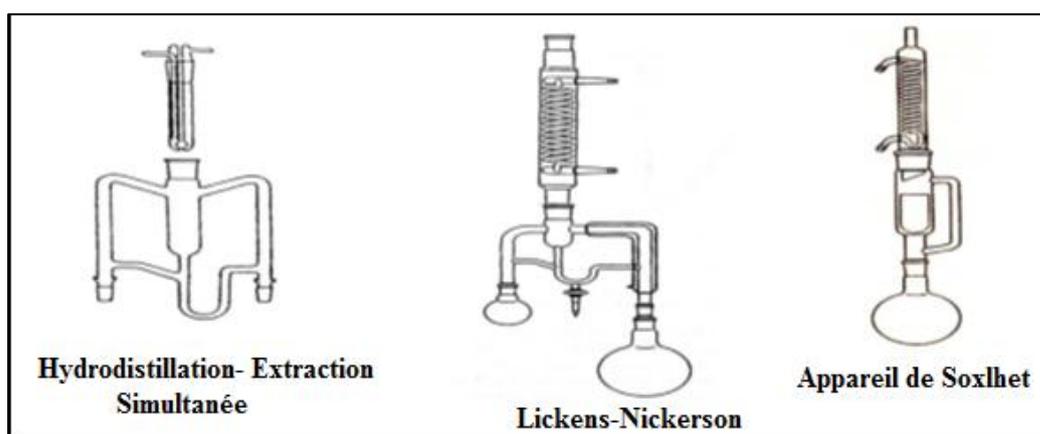


Figure 9 : différents outils utilisés pour l'extraction par solvants volatils (BRIAN, 1995).

Cette technique est utilisée pour les plantes fragiles et comme il est difficile d'éliminer complètement les traces de solvants, on utilise que très exceptionnellement ces HE en médecine (LARDY et HABERKORN, 2007).

5.5.Extraction par micro-ondes

Dans une enceinte close où la pression est réduite de manière séquentielle, les espèces végétales sont chauffées par micro-ondes, les composés volatiles sont entraînés par la vapeur d'eau formée à partir de la plante elle-même et sont alors récupérés par condensation, refroidissement et décantation. Ce type d'extraction nous permet un gain de temps et d'énergie (MENGEL *et al.*, 1993 ; LUCCHESI *et al.*, 2007).

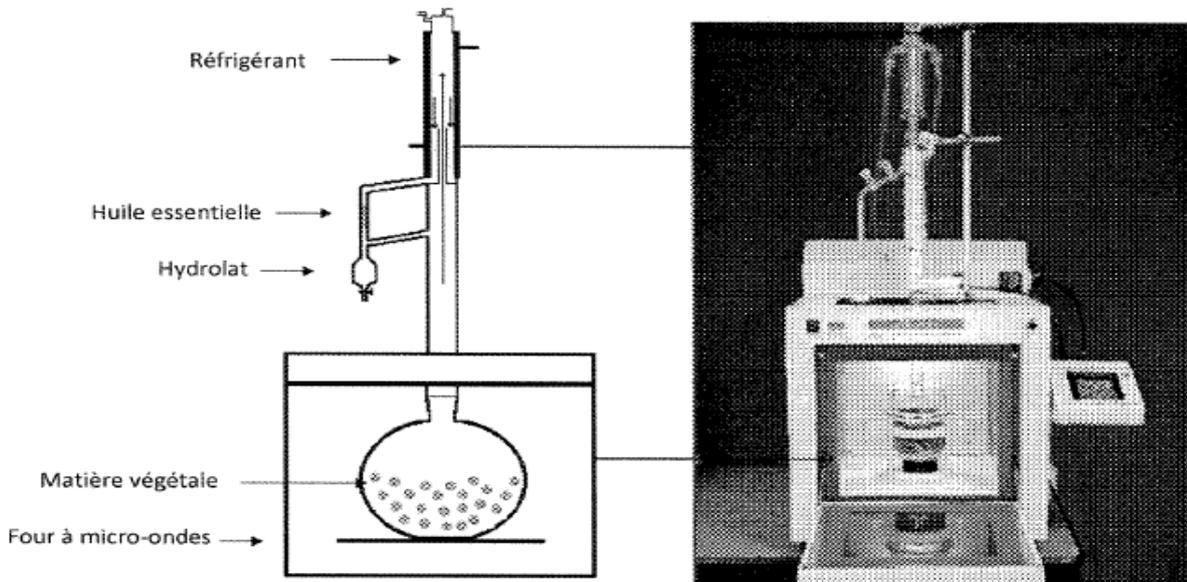


Figure 10 : Système d'extraction des huiles essentielles par micro-ondes (LUCCHESI *et al.*, 2007).

5.6. Extraction par les corps gras

Cette technique consiste à faire absorber les HEs par des corps gras, que l'on doit séparer ensuite pour obtenir l'HE pure, elle est utilisée pour traiter les parties fragiles de la plante comme les fleurs, en mettant à profil la liposolubilité des composés odorants de ces végétaux dans les corps gras (BRUNETON, 1999).

Dans ce type de procédé on peut distinguer l'enfleurage (la saturation) qui se fait par diffusion des arômes vers le corps gras à température ambiante et la digestion qui se pratique à chaud, par immersion des organes végétaux dans le corps gras (BRIAN, 1995).

5.7.Extraction au CO₂ supercritique

Le solvant utilisé dans cette technique est le CO₂ supercritique (au-delà du point critique P= 73,8 bars, T = 31,1 °C), le CO₂ possède alors des propriétés entre celles des liquides et celles des gaz, lui conférant ainsi un bon pouvoir d'extraction. Cette technique présente plusieurs avantages, tout d'abord car le CO₂ supercritique est non toxique, se trouve à l'état naturel, ininflammable, sélectif, disponible, et de qualité irréprochable (MOYLER, 1993 ; PIOCHON, 2008).

6. Facteurs de variabilité des huiles essentielles

On sait aujourd'hui que les plantes peuvent interagir avec leur environnement, et que la composition chimique de leur métabolites peut changer, la composition des HEs est donc fluctuante selon les conditions géographiques, climatiques et selon l'ensoleillement, l'hygrométrie... donc les HEs sont variables et les facteurs qui influencent cette variabilité sont :

- La diversité selon l'organe végétal: la composition chimique des HEs peut varier d'un organe à un autre, et ce même si elle est extraite de la même espèce végétale (BRUNETON, 1999) ;

- Influence de la période de récolte: la proportion des différents constituants d'une huile essentielle peut varier de manière considérable au cours du développement de l'espèce végétale dont elles seront extraites, par exemple la teneur en linalol chez la coriandre (*Coriandrum sativum*) est 50% plus élevée chez le fruit mûr que chez le fruit vert et chez la menthe on a remarqué une différence de composition chimique entre les bords et le centre de la feuille (BRUNETON, 1993 ; RANDRIANALIJAONA *et al.*, 2005) ;

- Existence des variétés chimiques ou "chémotypes" : Une même espèce végétale peut donner des HEs de différente composition chimique selon les individus. Selon certain chercheurs, les chémotypes constituent des variétés chimiques, dont chacune possède un équipement enzymatique particulier déterminé génétiquement au sein d'une même espèce (ZHIRI, 2006) ;

- Influence des facteurs extrinsèques ; donc l'influence de l'environnement et de la réaction du végétal à cette interaction avec le milieu (GUIGNARD, 1983) ;

- Influence du procédé d'obtention : Le procédé d'extraction peut aussi influencer la composition chimique des HE, car sous l'action du pH, de la température, de la teneur en oxygène, de la pression, de l'état d'hydratation, de nombreuses réactions peuvent se produire, telle l'hydrolyse, l'oxydoréduction, déshydratation. Sans oublier la forme du réacteur, la nature des matériaux de construction des appareils, la façon dont l'extraction est faite. (VILJOEN *et al.*, 2006 ; SEFIDKON *et al.*, 2007).

7. Toxicité des HE

Les huiles essentielles peuvent être toxiques, et ce selon la dose administrée, mais aussi de la voie d'exposition, par ingestion (souvent d'une grande quantité, et avec utilisation aléatoire), par contact (exposition à d'importantes concentrations) (DEGRYSE et *al.*, 2008).

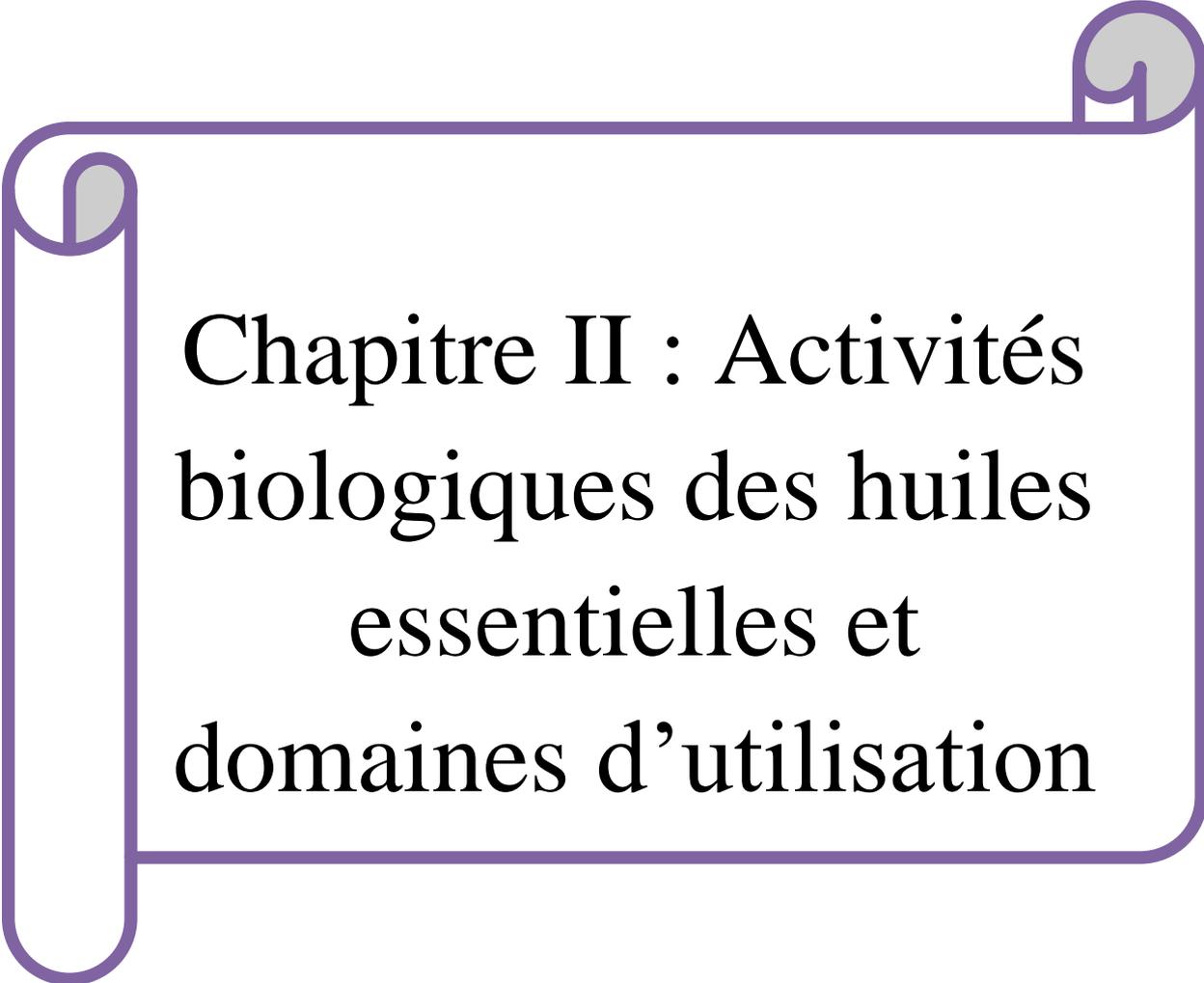
Certaines huiles essentielles peuvent provoquer des irritations au niveau de la peau, d'autres peuvent être allergène, photo-toxiques et certaines ont un effet neurotoxique, ou peuvent induire au développement de cancer tel que les dérivés d'allylbenzènes ou de propénylbenzènes (PIOCHON, 2008).

Selon BRUNETON (1999), généralement les huiles essentielles ont une toxicité aigüe par voie orale faible ou très faible : la majorité des huiles qui sont couramment utilisées ont une dose létale (DL₅₀) comprise entre 2 et 5 g/kg (Anis, Eucalyptus, Girofle...etc.) ou, ce qui est le plus fréquent, supérieure à 5 g/kg (Camomille, Lavande...etc.). D'autres, une quinzaine, ont une DL₅₀ comprise entre 1 et 2 g/kg : Basilic, Estragon, Hysope (1,5ml/kg). Les plus toxiques sont les huiles essentielles de Boldo (0,13 g/kg ; convulsions apparaissant dès 0,07 g/kg), de Chénopode (0,25 g/kg), de Thuya (0,83 g/kg), ainsi que l'essence de moutarde (0,34 g/kg). Quant à la toxicité chronique des HEs, elle est assez mal connue.

8. Conservation des HE

Les HEs peuvent être conservées pendant plusieurs années, et peuvent même s'améliorer avec le temps (sauf pour les HE extraites à partir des zestes d'agrumes dont la conservation ne doit pas dépasser 2ans).

Leurs conservation se fait de préférence dans des flacons en verre (les HE sont réputées « ronger » les plastiques) ambre ou foncé afin de les protéger de la lumière, tout en évitant de les exposer à de forts écarts de températures, ou de les mettre en contact de l'air, en s'assurant de bien fermer les flacons après usage pour éviter l'évaporation des arômes dans l'atmosphère (LARDY et HABERKORN, 2007). D'après BECHAALANI (2005), les flacons doivent être stockés en position verticale pour éviter le contact entre l'huile essentielle et le bouchon, vu que cette dernière peut avoir un effet corrosif sur le bouchon, ainsi les huiles essentielles peuvent être conservées pendant plusieurs années. Par contre selon LARDY et HABERKORN (2007), les HEs étant très volatiles par nature peuvent rapidement perdre leurs propriétés. Au mieux, elles peuvent conserver leurs propriétés thérapeutiques pendant environ 3ans.



Chapitre II : Activités
biologiques des huiles
essentielles et
domaines d'utilisation

1. Activités biologiques des huiles essentielles

Les activités biologiques des HEs dépendent directement de la composition chimique de ces dernières, les phénols entraînent notamment des lésions irréversibles sur les membranes et sont utilisés dans les infections bactériennes, virales et parasitaires, quelle que soit leur localisation, généralement leur action dépend de l'effet combiner des composés actifs et inactifs (les composés inactifs peuvent par exemple influencer la biodisponibilité des composé actifs), mais cela dit les mécanismes d'action ne sont pas encore totalement élucider, ce qui est due à la composition chimique complexe des HEs, la présence de composants mineurs pouvant agir comme modulateurs, ainsi que la présence de composés encore non identifiés et les actions de synergie et/ou d'antagonisme entre ces différents composants (SVOBODA *et al.*, 1999 ; BEL HADJ SALAH-FATNASSI *et al.*, 2010 ; GABRIEL *et al.*, 2013 ; SOKOVIĆ *et al.*, 2013).

D'après TEKE *et al.* (2013), les huiles essentielles ont plusieurs activités biologiques à savoir l'activité antibactérienne, antifongiques, antivirale, pesticide et même une activité anti-cancéreuses.

1.1. Activité antimicrobienne

On entend par activité antimicrobienne l'ensemble des activités qu'exerce l'HE sur les micro-organismes donc on a :

1.1.1. Activité antibactérienne

Les HEs exercent un pouvoir bactéricides ou bactériostatique à l'égard des bactéries pathogènes et même celles qui sont résistantes aux antibiotiques, cet effet peut s'avérer essentielle dans divers domaine comme le domaine agro-alimentaire (conservation) et pharmaceutique. Suite à la différence dans la composition chimique et structurale des constituants des HEs ces derniers n'ont pas de site d'action spécifique au niveau cellulaire, cette différence conduit également au fait que les résultats de plusieurs études sur l'activité antibactérienne des HEs soient différents ce qui est due aussi aux types d'extractions, récolte et culture des plantes à HE (BRUNETON, 1999 ; HAMMER *et al.*, 1999 ; BAKKALI *et al.*, 2008 ; SAKKAS, 2017).

L'effet antibactérien des HEs est beaucoup plus important chez les bactéries Gram positif que chez les bactéries Gram négatif car ces dernières possèdent une membrane externe supplémentaire au niveau de leur paroi qui leur confère une protection contrairement aux bactéries Gram positif qui ne possèdent que le peptidoglycane malgré que ce dernier est plus épais chez ce type de bactéries (GABRIEL *et al.*, 2013). Car selon BUCHBUAUR et LANG (2011), *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa* sont les deux bactéries Gram négatif les plus résistantes aux HEs, mais cela dit il y a certaines d'entre elles qui sont sensibles aux HEs comme par exemple : aux HEs issues de *R. officinalis* et *N. cataria*.

Grace à leur nature lipophile les HEs peuvent traverser la paroi et la membrane cytoplasmique des bactéries et endommager les structures membranaires (couche phospholipidique, polysaccharides...) et ainsi la perméabiliser, cette perméabilité est associée à la perte d'ions et la réduction du potentiel membranaire et ainsi effondrement de la pompe à protons. Une fois pénétrer à l'intérieur les HEs peuvent provoquer une coagulation du cytoplasme et endommager les lipides et protéines. De telles perturbations conduisent généralement à la lyse cellulaire. Le mode d'action antibactérien des HEs est résumé par la figure ci-dessous (BAKKALI *et al.*, 2008).

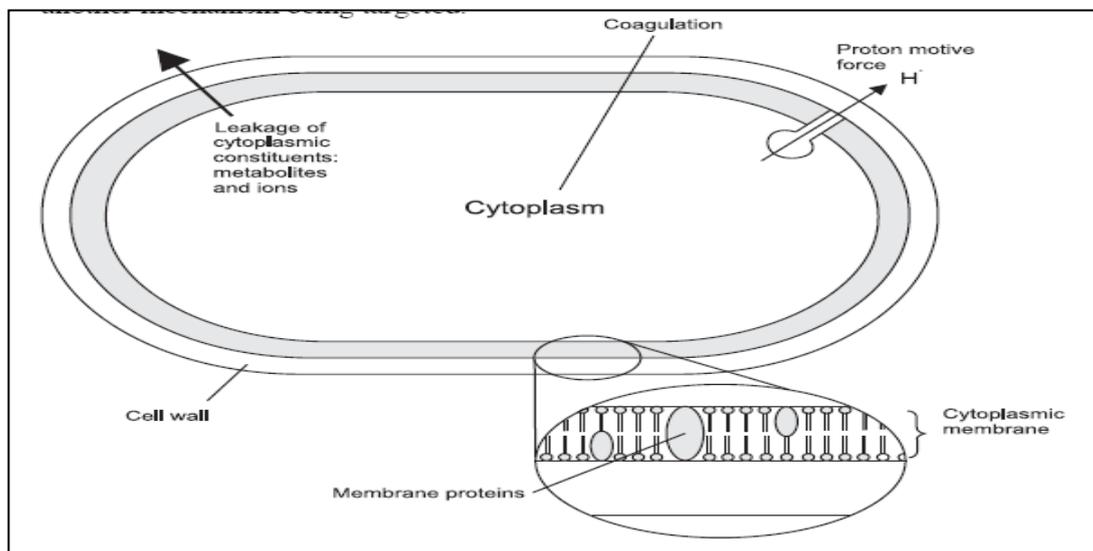
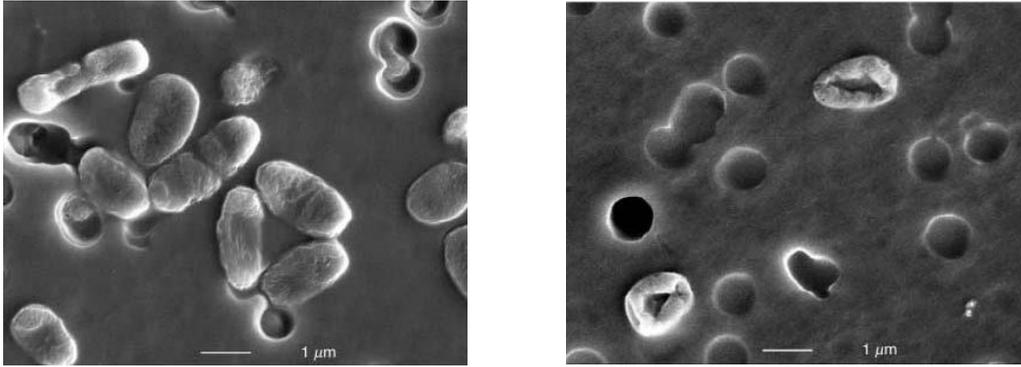


Figure 11 : Emplacements et mécanisme d'action, considérés comme des sites d'action pour l'HE dans la cellule bactérienne (BURT, 2004).

Dégradation de la paroi cellulaire, perméabilité de la membrane cytoplasmique; destruction des protéines membranaires, Fuite du contenu cellulaire, La coagulation du cytoplasme, et l'épuisement de la force proton-motrice



A

B

Figure 12 : Image d'*E.coli* O157:H7 vue sous microscope électronique à balayage (x12000) après traitement avec l'huile essentielle d'origan (BURT et REINDERS, 2003).

(A) cellules bactériennes non traitées (de control), (B) cellules bactériennes traitées avec 625 $\mu\text{l.l}^{-1}$ d'huile d'origan

Selon BURT (2004), les HEs contiennent un ensemble de composant qui se sont avéré responsable de l'activité antimicrobienne et parmi eux on peut citer : carvacrol, thymol, eugénol, perillaldéhyde, cinnamaldéhyde et l'acide cinnamique et d'après BASSOLÉ et JULIANI (2012), l'HE en son intégrité possède un pouvoir antimicrobien plus élevé que le mélange de leurs principaux composants.

L'évaluation de l'activité antibactérienne peut se faire suivant deux méthodes principales qui sont : la méthode de diffusion dans l'agar (utilisation de disques imprégnés d'HE ou des puits) et la méthode de dilution d'agar et de bouillon ;ces méthodes sont rapides et simples mais présentent l'inconvénient du fait que les HEs sont non miscible dans l'eau d'où la nécessité d'ajouter des solvants (Dimethyl Sulfoxyde et l'éthanol) ou des détergents (tween 20) au milieu de culture, ainsi que la volatilité des HEs pendant l'incubation , elles sont aussi considérées par certains auteurs comme étant qualitative uniquement (DEANS et RITCHI, 1987 ; HAMMER *et al.*, 1999 ; BURT, 2004 ; KALEMBA et KUNICKA, 2003, BENCHEQROUN *et al.*, 2012 ; MEHANI et SEGNI, 2014 ; CHAHBOUN *et al.*, 2015).

D'après KALEMBA et KUNICKA (2003), d'autres méthodes non conventionnelles sont également utilisées, parmi ces méthodes on peut citer: la technique par micro-atmosphère, bio-autographie, par turbidimétrie...

L'évaluation de l'activité antimicrobienne peut être influencée directement par la méthode suivie pour cette évaluation, mais d'autres facteurs rentrent également en jeu comme : l'origine des souches microbiennes testées, le type d'agent émulsifiant utilisé, les conditions de culture (aérobie ou anaérobie, température d'incubation, la charge microbienne) (KALEMBA et KUNICKA, 2003).

1.1.2. Activité antifongique

De nombreuses HEs possèdent une activité antifongique sans avoir d'effets secondaire sur la santé de l'homme ou l'animal, plusieurs études *in vitro* et *in vivo* démontrent que les HEs peuvent être utilisés comme des agents antifongiques aussi bien contre les dermatophytes que les phytopathogènes, sans apport de danger pour l'homme ou de pollution de l'environnement. Cette activité peut être attribuée aux composants suivants : le carvacrol, l'acétate α -terpinily, cymène, thymol, pinène, linalool, et surtout l'eugénol dérivé du phénylpropane, ainsi que le cinnamaldéhyde (aldéhyde aliphatique) qui s'avèrent être les plus actifs (CHANG *et al.*, 2006 ; VIDYASAGAR et NUZHAT, 2013 ; HAMDANI et ALLEM, 2015).

Les HEs possédant un pouvoir antifongique contre les champignons phytopathogènes appartiennent à la famille des Lamiaceae, l'un des modes d'action de ces HEs semble être la destruction du mycélium existant et l'inhibition du développement de nouveaux mycéliums ; par exemple l'HE de *Citrus sinensis* (L.) qui est riche en limonène exerce son pouvoir antifongique contre *Aspergillus niger* en détruisant sa paroi mycélienne, son activité est dose dépendante (BUCHBUAUR et LANG, 2012).

Selon HAMDANI et ALLEM (2015), l'activité antifongique de l'huile de *Citrus* est due à sa richesse en monoterpènes qui sont dotés d'un pouvoir pénétrant, ainsi en se diffusant à travers les structures membranaires fongiques ils les endommagent en provoquant leur perméabilité, ils inhibent également les enzymes intra et extracellulaires et affectent la synthèse enzymatique (dans le noyau ou ribosome) en agissant en tant que régulateur du métabolisme cellulaire, et peuvent empêcher l'absorption de nutriments provenant de l'environnement ce qui affecte la croissance des champignons.

L'évaluation de l'activité antifongique se fait généralement par la méthode de contact directe préférablement sur milieu agar de dextrose de pomme de terre (PDA) supplémenté d'huiles essentielles à différentes proportions, mais peut également se faire par la méthode de diffusion sur géloses en utilisant des disques imprégnés d'HE (CHANG *et al.*, 2006 ; AERESLAN et DERVIS, 2010 ; ISMAILI *et al.*, 2014).

Selon BUCHBUAUR et LANG (2012), plusieurs HEs exercent une activité inhibitrice contre les levures et plus précisément contre *Candida albicans*, ces HEs ont été caractérisés par une teneur élevée en thymol, carvacrol, Cymène, linalool ou α -pinène et appartiennent à la famille des Lamiaceae.

1.1.3. Activité antivirale

Les virus sont généralement sensibles aux HEs car de nombreuses pathologies virales qui sont connues comme étant sévères montrent une amélioration suite à l'utilisation de ces HEs par exemple : l'HE provenant de la plante *Artemisia arborescens* L. possède une activité antivirale remarquable contre le virus de l'herpès complexe 1 et 2 qui est due à un effet virucide directe en inhibant le virus et empêchant sa diffusion de cellule en cellule. Parmi les composants des HEs c'est les monoterpénols et les monoterpénals qui se sont avérés les plus fortement antivirales (ZHIRI, 2006 ; BUCHBUAUR et ADORJAN, 2010).

Le mode d'action des HEs contre le virus de l'herpès simplex HSV1 a pu être observé par microscopie électronique et consiste en la perturbation de l'enveloppe virale empêchant ainsi les cellules hôtes d'être infectées (BAKKALI *et al.*, 2008).

Selon BEL HADJ SALAH-FATNASSI *et al.* (2010), l'HE de *Thymus capitatus* (L.) Pourrait agir à deux niveaux quand elle est en contact avec le virion :

- 1- au niveau de la capsid dans le cas des virus nus (Echovirus et Adénovirus) ;
- 2- au niveau de l'enveloppe dans le cas des virus enveloppés (virus de l'herpès simplex).

Les résultats de son étude ont démontrés que l'HE de *Thymus capitatus* (L.) a une bonne activité antivirale par la neutralisation du virus de l'herpès simplex HSV1 et de l'echovirus 11 après contact direct et l'inhibition de leur adsorption/pénétration dans la cellule cible ainsi que l'inhibition de la réplication de l'adénovirus au sein de la cellule.

1.2. Activité pesticide

Actuellement l'utilisation de produits chimiques de synthèse en tant que pesticides soulève plusieurs préoccupations évidentes qui sont d'une part liées à la santé humaine et l'environnement et d'une autre part à la résistance des ravageurs aux pesticides, pour cela on a tendance à se pencher beaucoup plus vers les bio-pesticide. Dans ce contexte les HEs sont les candidats de choix suite à leurs activités insecticides, molluscides, nématocides, germicides, herbicides (CHENG *et al.*, 2004 ; CHIASSON et BELOIN, 2007 ; BUCHBUAUR et ADORJAN, 2010).

1.2.1. Activité insecticide

L'activité insecticide des HEs est la plus couramment étudiée ; les HEs sont considérés en tant que larvicides, ovicides, adulticides, répulsifs ou inhibiteurs de croissance (KETOH *et al.*, 1998 ; NOUDOGBESSI *et al.*, 2008 ; FURET et BELLENOT, 2013).

Leur mode d'action peut être d'une part, la perturbation de la structure de la membrane cellulaire, mais pour certaines, des effets neurotoxiques ont pu être mis en évidence, dus à des interactions avec des neurotransmetteurs tels que le GABA (acide gamma-aminobutyrique) et l'octopamine, ou par inhibition de l'acétyl cholinestérase et pour d'autres la potentialisation de l'action d'autres molécules en inhibant les cytochromes P450 qui, normalement les détoxifient. D'une autre part, par interaction avec les récepteurs d'odeur des insectes, déclenchant des comportements variés : fuite, attraction... (FURET et BELLENOT, 2013 ; ZAHARAN *et al.*, 2017).

Les effets des HEs sur les insectes peuvent se traduire soit par toxicité par fumigation tel que l'effet toxique de l'HE de *Callistemon citrinus* par fumigation contre les adultes de *Callosobruchus maculatus* (F.) (ZANDI-SOHANI *et al.*, 2013). Ou bien par toxicité par contact, ou par des mécanismes toxiques d'ordre physiques et physiologiques en agissant directement sur la cuticule des insectes et acariens à corps mou et en affectant la croissance, la mue, la fécondité et le développement des insectes et acariens (CHIASSON et BELOIN, 2007).

1.2.2. Activité herbicide

D'après FURET et BELLENOT (2013), les études menées sur l'activité herbicides des HEs sont nombreuses et s'agissent généralement de test d'inhibition de germination de graines. Les HEs les plus herbicides sont : les HEs à phénols (thymol, carvacrol), à cétones (carvone, pulégone) ou à étheroxydes (eucalyptol ou 18-cinéol).

Le mode d'action des herbicides issus des HEs diffère du mode d'action des herbicides chimique commercialisé, par exemple la leptospermone de l'huile essentielle de *Leptospermum scoparium* agit en inhibant la HPPD (ou p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase), qui entraîne une décoloration et un flétrissement des adventices (mauvais herbe), cette HE est plus active que la leptospermone seule.

1.3. Activité anti-inflammatoire

Les HEs sont constituées majoritairement de terpénoïdes (monoterpènes et sesquiterpènes) ainsi que leur dérivés oxygénés, suite à leurs bas poids moléculaires ils diffusent facilement dans les cellules pour induire des réactions biologiques, parmi ces réaction il y a l'activité anti-inflammatoire qui est de plus en plus étudiée ces dernières années (CHANG *et al.*, 2005).

Plusieurs études ont démontré que la combinaison entre deux HEs par exemple la combinaison entre le thymet l'origan est capable de réduire la production des cytokines pro-inflammatoires (BUCHBUAUR et ADORJAN, 2010). Selon CHANG *et al.* (2005), des études sur l'activité anti-inflammatoire ont révélé que Les HEs de certaines Lamiaceae peuvent réduire la production de carraghénine qui est responsable de l'inflammation de la patte arrière chez le rat, et le même auteur a démontré que l'HE des feuilles de *Cinnamomum osmophloeum* possède une activité anti-inflammatoire clair.

1.4. Activité anti-oxydante

L'auto-oxydation des lipides est un phénomène chimique très complexe mettant en jeu des réactions radicalaires qui se déroulent en présence d'oxygène atmosphérique et qui sont capables de s'auto-entretenir. Elle est responsable de la formation de produits chimiques nuisibles à la santé humaine et animale (AVLESSI *et al.*, 2004).

Un antioxydant est une substance capable de neutraliser les radicaux libres et ainsi ralentir le phénomène d'oxydation lorsqu'il est rajouté à un produit naturellement oxydable à l'air et protège le corps humain contre les radicaux libres qui induisent le stress oxydatif. Ces antioxydants sont très importants en industrie agro-alimentaire et vu que ceux de synthèse sont remis en cause à cause de leurs risques toxicologiques les antioxydants naturels sont valorisés et dans ce contexte les HEs sont des candidats de choix (AVLESSI *et al.*, 2004 ; BUCHBUAUR et ADORJAN, 2010 ; DEVI *et al.*, 2013).

Selon plusieurs études, les HEs possèdent un pouvoir antioxydant redoutable, par exemple l'HE de *Psammogeton canescens* (DC.) a un pouvoir antioxydant plus puissant que les extraits méthanoliques de la même plante. L'évaluation de cette activité se fait généralement par la méthode de DPPH (1,1 Diphényl 2 Pycril Hydrazil). Les principaux composés responsables de cette activité sont : les phénols (comme le thymol et carvacrol) et les polyphénols (BUCHBUAUR et ADORJAN, 2010 ; MARIN *et al.*, 2012 ; DEVI *et al.*, 2013 ; MARINE *et al.*, 2013).

1.5. Autres activités

Selon BUCHBUAUR et ADORJAN (2010), en plus des activités citées précédemment les HEs en possèdent d'autres parmi elles on a :

- L'activité antalgique qui a été reportée suite à certaines études, il s'agit soit de l'activité de l'huile en entier ou bien de certains de ces composants comme par exemple l'HE d'*Hyptis pectinata* L. qui possède un pouvoir antalgique assez important ;
- L'activité anticancéreuse qui peut être attribuée aux alcools monoterpéniques et aux hydrocarbures sesquiterpéniques. Cette activité se manifeste généralement par l'apoptose des cellules tumorales.

2. Domaine d'utilisation des huiles essentielles

2.1. Industrie pharmaceutique

Les huiles essentielles sont utilisées en industrie pharmaceutique en tant qu'antiseptiques externes et ce grâce à leurs propriétés bactéricides, antifongiques, bactériostatiques, protectrices...

Exemples de certaines HEs utilisées en industrie pharmaceutique :

- L'huile essentielle d'eucalyptus qui grâce à ses propriétés anti-infectieuses et cicatrisantes, est largement utilisée dans le domaine pharmaceutique ;
- L'huile essentielle de la menthe utilisée pour le traitement de l'inflammation des voies respiratoires (BALAKRISHNAN, 2015).

Les HEs sont également utilisées dans l'aromatisation de certains médicaments destinées à la voie orale et constituent principalement le support de l'aromathérapie (BRUNETON, 1999).

2.2. Parfumerie et cosmétologie

La parfumerie est le principale débouché des huiles essentielles, à fin de réaliser les transformations nécessaires, l'industrie de la parfumerie utilise les extraits naturels des huiles essentielles sélectionnés pour leur qualité olfactive irremplaçable et leur puissance additionnés à des constituants issus de la synthèse chimique (BRUNETON, 1993).

On a l'exemple de l'huile essentielle du Vétiver qui est recherchée en cosmétologie ainsi qu'en parfumerie pour son agréable odeur, elle joue le rôle de fixateur naturel en étant associée à d'autres HE telles que la rose, ou le santal (JOUHANNEAU, 1991).

2.3. Industrie agro-alimentaire

Des études ont montrés que les huiles essentielles pouvaient être appliquées à tous les produits alimentaires, comme les HEs d'origan, de cannelle, ou de thym, qui sont efficaces pour les volailles, les viandes, les charcuteries et les légumes. L'HE de la menthe pour les produits frais (salades, yaourt...) et l'HE du citral pour les poissons...

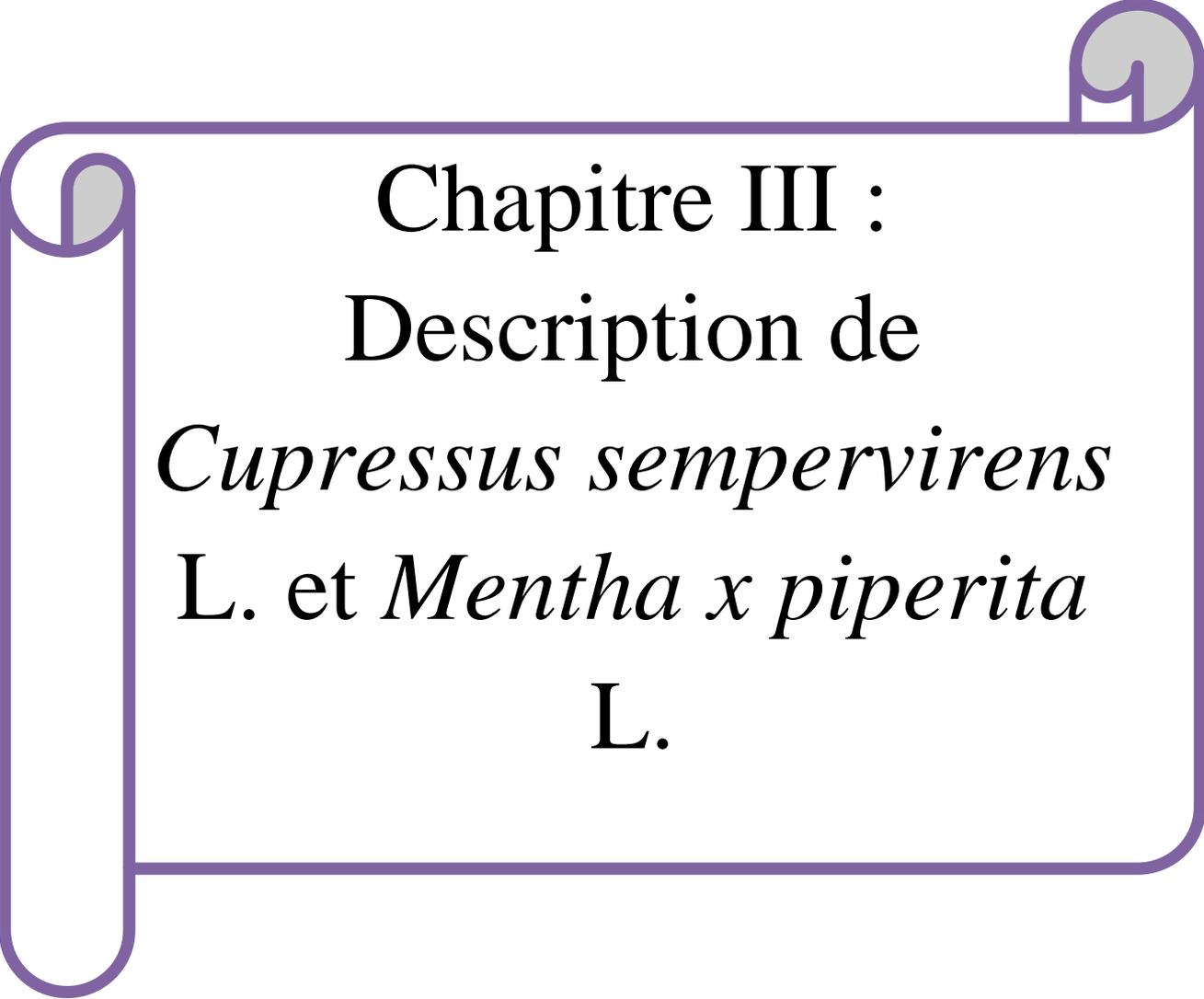
Les huiles essentielles sont aussi utilisées pour donner de la saveur et de l'arôme pour le café, le thé, les vins, ainsi qu'aux liqueurs distillées (CAILLET et LACROIX, 2007).

Les HEs contribuent au maintien de la qualité microbiologique de la viande hachée du bœuf ainsi qu'à la réduction de l'oxydation des gras. L'utilisation des HEs augmente la

sensibilité des bactéries dans les différentes étapes de la conservation des aliments (CAILLET et LACROIX, 2007).

2.4.Industrie chimique

Les HEs peuvent être utilisées comme matière première pour la synthèse de principes actifs des médicaments, des vitamines ou de substances odorantes. Par exemple l'exploitation des HEs de la térébenthine pour l'extraction des pinènes qui sont des molécules chimiques de haute importance, permettant la synthèse de nombreux produits notamment dans le domaine de la parfumerie (BIGNELL *et al.*, 1996). Les HEs sont également utilisés comme produit désodorisant, permettant de purifier l'air respirable (JOUHANNEAU, 1991).



Chapitre III :
Description de
Cupressus sempervirens
L. et *Mentha x piperita*
L.

1. *Cupressus sempervirens* L.

1.1. Classification botanique

Domaine : Biota

Règne : Plantae

Sous-règne : Viridiplantae

Division : Magnoliophyta

Classe : Equisetopsida

Sous-classe : Pinidea

Ordre : Cupressales

Familles : Cupressaceae

Genre : *Cupressus* L.

Espèce : *Cupressus sempervirens* L.



Figure 13: Photographie de *Cupressus sempervirens* L. (GHARBI, 2005).

1.2. Description botanique

Le *Cupressus sempervirens* L. est communément appelé cyprès vert ou de Provence ou encore le cyprès commun et aussi cyprès d'Italie (CHARPIN *et al.*, 2013).

Le cyprès vert est un grand arbre à écorce lisse gris-rougeâtre avec 15 à 20m de hauteur (peut atteindre 30 à 40m) et un tronc bien développé (peut atteindre 3m), cet arbre grandit rapidement jusqu'à l'âge de 20ans et sa longévité peut atteindre 500ans (GHARBI, 2005).

Ses feuilles sont persistantes, aromatiques, verts foncé et sont disposées en écailles fines le long des rameaux ; elles les recouvrent étroitement en formant à chaque fois une rangé de 4 écailles poussant tout autour des rameaux (RIOM, 2010).

Les fleurs unisexuées sont situées aux extrémités des rameaux et sont groupées en chatons, dont on distingue les chatons mâles de couleur jaune à brun clair chargés en pollen pouvant être allergisant (en février – mars), les chatons femelles sont verts globuleux réunis en bouquet à l'extrémité des jeunes pousses (NICHANE, 2015).

Les cônes femelles sont globulaires (2-4 cm), brillant, opposées transversalement sur un axe court. Les écailles ovulifères portent de nombreux ovules. Les graines sont irrégulières, brun brillant et étroitement ailé. La floraison a lieu au printemps; Les cônes mûrissent au printemps suivant (GHARBI, 2005).

1.3. Origine et répartition géographique

D'après MANTEUUIS (1985), le cyprès vert est originaire de l'est du bassin méditerranéen. Il est localisé généralement autour de la méditerranée entière, le Nord-africain (Algérie, Tunisie, Maroc), ainsi que la Grèce, la Crète et l'Asie occidentale (GHARBI, 2015). Comme nous le montre la figure suivante :

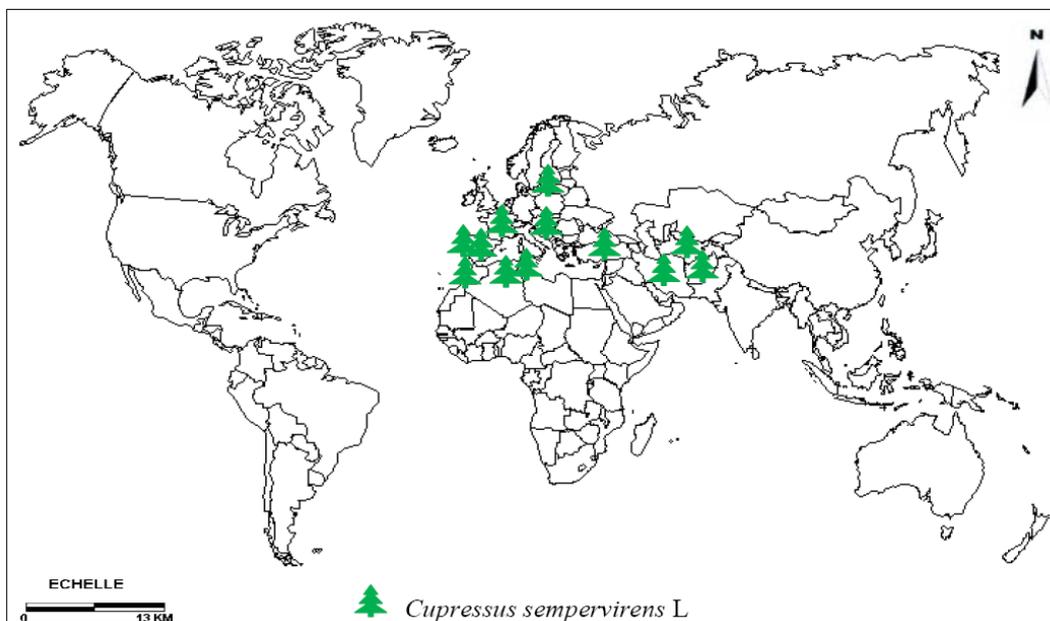


Figure 14 : Aire de répartition du *Cupressus sempervirens* L. (NICHANE, 2015).

1.4.Utilisation

Le cyprès vert est utilisé depuis longtemps en zone agricole comme coupe-vent, il a connu un développement considérable comme haies des résidences et jardins privatifs avec le développement des banlieues à partir des années 1970. Il est aussi beaucoup utilisé en médecine traditionnelle et les parties utilisées sont les feuilles et les cônes par exemple contre les hémorroïdes, au Cameron les branches de feuilles séchées sont utilisées pour protéger leurs stocks de graines contre les infestations d'insectes (TAPONDJOU *et al.*, 2004 ; GHARBI, 2005 ; CHARPIN *et al.*, 2013).

En phytothérapie l'extrait du cyprès est incorporé dans les préparations (pommades et suppositoires) utilisés pour traiter les hémorroïdes et les varices; Il est excellent pour les troubles la circulation veineuse. L'huile essentielle du cyprès est un antiseptique et antispasmodique (GHARBI, 2005).

1.5.Huile essentielle de *Cupressus sempervirens* L.

L'HE du Cyprès est obtenue par distillation à la vapeur d'eau des aiguilles et des extrémités de rameaux. Cette HE est constitué majoritairement de monoterpènes (82%) et les principaux monoterpènes qu'on y rencontre sont : α -pinène, β -myrcène, δ 3-carène, limonène et terpinolène, ainsi que les sesquiterpènes dont les principaux sont : δ -cadinène, α -cubécène, α -humulène et β -cariyophyllène (PIOVETTI *et al.*, 1980 ; YANI *et al.*, 1983 ; SHIRNER, 2004 ; TAPONDJOU *et al.*, 2005).

Cette HE possède un pouvoir antiseptique, spasmolytique, hémostatique, diurétique, elle est également fortifiante, tranquillisante, neutralise les odeurs et nettoie les vaisseaux. De ce fait, ces utilisations sont variées dont on peut citer : utilisée en cas d'asthme, de bronchite, de troubles d'irrigation sanguine, de kystes ovariens, d'hémorroïdes, de varices, de douleurs veineuses... (SHIRNER, 2004).

Selon TAPONDJOU (2005), l'HE du cyprès vert possède un pouvoir insecticide et répulsif (contre les insectes).

2. *Mentha x piperita* L.

2.1. Classification

Règne : Plantae

Division : Magnoliophyta

Classe : Lamiales

Ordre : Magnoliopsida

Famille : Lamiaceae

Genre : *Mentha*

Espèce : *Mentha piperita* L.



Figure 15 : Photographie de *Mentha x piperita* L.

2.2. Description botanique

La menthe poivrée (*Mentha x piperita* L.) est une plante aromatique, hybride entre la menthe verte (*Mentha spicata*) et la menthe aquatique (*Mentha aquatica*), elle existe dans les régions tempérées du monde (KUMAR *et al.*, 2014).

C'est une plante vivace à rhizome long, rampant, traçant et chevelu, la tige est dressée ou ascendante de 50 à 80 cm de long, qui se divise en rameaux opposés, contenant des feuilles ovales, opposées, lancéolées, aigües, dentées, de couleur verte, se teintant de nuances rougeâtres au soleil, et d'un rouge cuivre à l'ombre, recouvertes de gros poiles sécréteurs dans lesquelles s'accumulent les substances volatiles odorantes, elles mesurent de 4 à 10 cm de long (BRUNETON, 2009).

Elle contient des fleurs violacées qui forment des épis ovoïdes très courts à l'extrémité des rameaux. Le fruit entouré d'un calice persistant, est divisé en quatre parties et doté d'une odeur puissante et de saveur piquante et rafraichissante (BENAYAD, 2013).

2.3. Origines et répartitions géographique

La menthe poivrée trouve ses origines au Moyen-Orient (a été cultivé par les anciens égyptiens) ainsi qu'en Asie. Elle est largement cultivée dans les régions tempérées du monde, en particulier en Europe, en Amérique du nord et en Afrique du nord, mais actuellement elle se retrouve sur tous les continents et s'adapte à tous les climats, hormis les plus extrêmes, elle préfère les terrains frais argileux et calcaires. Sa culture est essentiellement réalisée pour produire des huiles essentielles (SINGH *et al.*, 2015).

2.4. Utilisation

La menthe est riche en en fer, en vitamine C, en antioxydants, elle a des vertus digestives, antiseptiques, stimulantes et antispasmodiques, elle est utilisée contre la fièvre, la toux la faiblesse, les maux d'estomac, les nausées, la mélancolie, le traitement du côlon irritable, le catarrhe des voies respiratoires et l'inflammation de la muqueuse buccale, ainsi que l'hystérie et stimule le système nerveux, elle a un pouvoir antiseptique, analgésique et vermifuge, les tiges et les feuilles sont aussi utilisée comme anti parasites (CATIER et ROUX, 2007 ; BENAYAD, 2013 ; BALAKRISHNAN, 2015).

En agro-alimentaire elle est utilisée comme aromatisant pour donner du goût et de la saveur aux aliments (KUMAR *et al.*, 2014). Elle peut aussi se trouver dans des cosmétiques telles que les shampoings et les savons (BENAYAD, 2013).

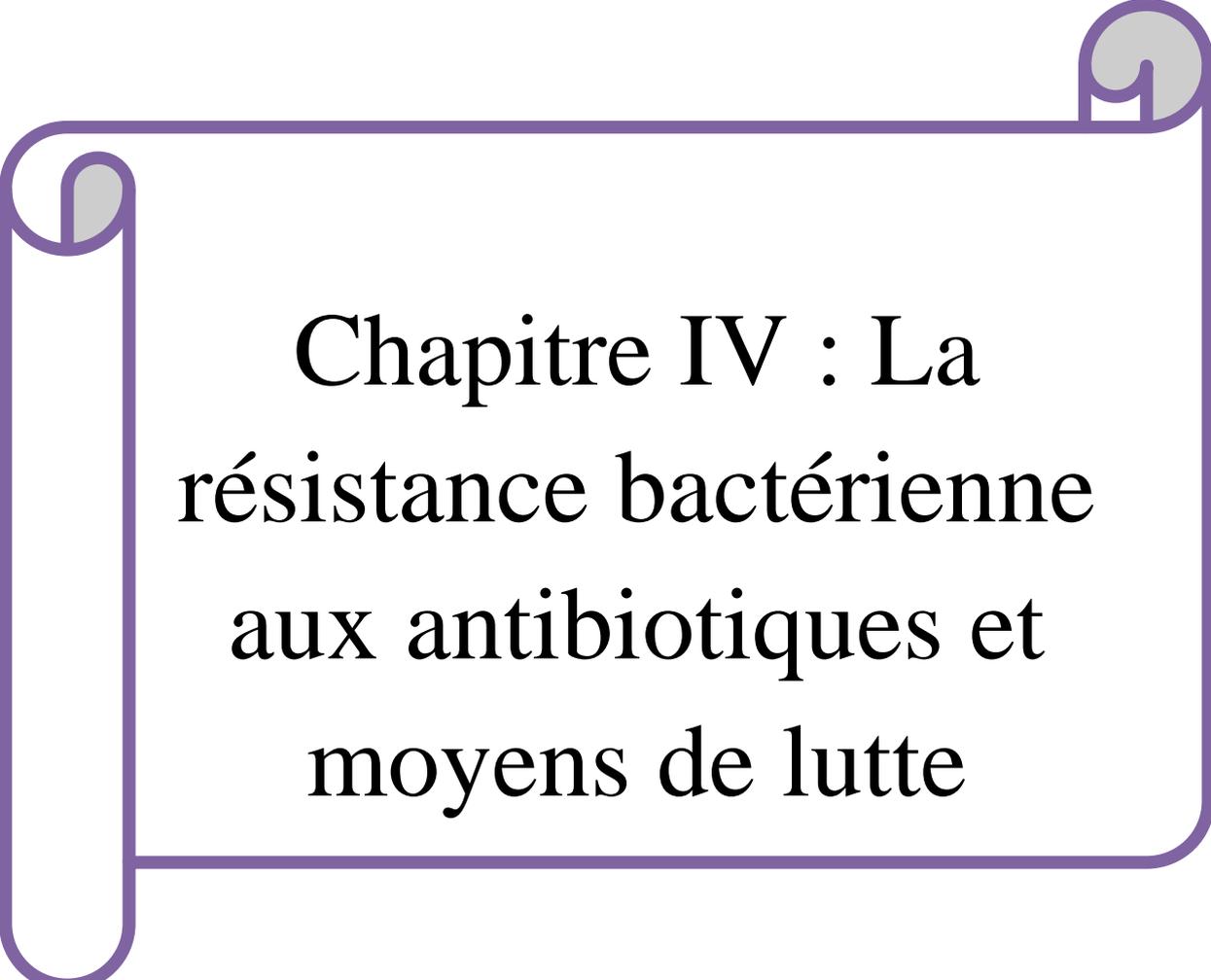
2.5. Huile essentielle de la menthe poivrée

L'huile essentielle de la menthe poivrée peut être la plus polyvalente, de par son abondance de propriétés et d'utilisation, elle présente une couleur vert jaune ou vert clair, une saveur délicate et rafraichissante (SHIRNER, 2004 ; CATIER et ROUX, 2007).

L'huile essentielle de la menthe poivrée est extraite juste avant la floraison (en juin) à partir des parties aériennes de la plante, la méthode la plus utilisée pour son extraction est la distillation à la vapeur d'eau (SHIRNER, 2004).

Les principaux constituants chimiques des HEs extraites de la menthe poivrée sont : le menthol 35 à 70% (majoritaire) qui est responsable de la sensation de refroidissement, mais aussi antiseptique et très utilisée comme aromatisant et sert aussi à la préparation de formes galéniques comme les élixirs et la menthone de 20 à 30%, qui a un effet anti-inflammatoire, peut facilement traverser l'épiderme, facilite l'évacuation de la bile emmagasinée dans la vésicule biliaire, elle aide aussi à la digestion. La composition chimique de la menthe poivrée peut changer selon les conditions de production (SHIRNER, 2004 ; CATIER et ROUX, 2007).

En plus de ces constituants majeurs l'HEs de la menthe poivrée contient de l'acétate de menthyle, du menthofur et du 1,8-cineol, Caryophyllène et du pinène, ainsi que de petites quantités de composés supplémentaires, y compris le limonène, le pulegone (BALAKRISHNAN, 2015).



Chapitre IV : La
résistance bactérienne
aux antibiotiques et
moyens de lutte

1. Définition de l'antibiorésistance

Selon l'organisation mondiale de santé (OMS) l'antibiorésistance est : la résistance d'un micro-organisme à un antibiotique (ATB) auquel il était jusque-là sensible. Elle résulte de l'aptitude des bactéries à supporter l'attaque de médicaments antimicrobiens tels que les antibiotiques. Cette résistance apparaît lorsque le micro-organisme mute ou acquiert un gène de résistance (VINCENT et LE BÂCLE, 2015).

2. Les types de résistance

2.1. La résistance naturelle

On parle de résistance naturelle lorsqu'une espèce bactérienne est naturellement résistante à un antibiotique (soit à une molécule particulière ou à une classe d'antimicrobiens) c.-à-d. qu'elle est innée chez cette bactérie, par exemple : les bactéries anaérobies sont naturellement résistantes aux aminosides car leur passage à travers la membrane cytoplasmique nécessite un système de transport actif absent chez les anaérobies. Cette résistance dénommée intrinsèque est une caractéristique propre à une espèce bactérienne et elle est partagée par toutes les souches normales de cette espèce (GAUDY et BUXERAUD, 2005 ; BRIAND, 2009).

La résistance naturelle est transmissible de génération en génération et dépend de la nature de la bactérie et celle de l'antibiotique pouvant agir sur cette bactérie, elle permet d'établir le spectre d'activité des antibiotiques (VINCENT et LE BÂCLE, 2015).

Cette résistance a pour support génétique le chromosome bactérien donc elle est transmissible à la descendance mais elle n'est pas ou peu transmissible d'une bactérie à une autre au sein d'une même espèce ou au sein d'espèces différentes (mode de transmission horizontale) (TORTORA *et al.*, 2011).

2.2.Résistance acquise

La résistance aux antibiotiques est dite acquise lorsqu'une bactérie initialement sensible à un antibiotique devient résistante à ce dernier, il s'agit d'une caractéristique propre à certaines souches bactériennes d'un genre ou d'une espèce particulière et résulte d'une modification génétique par mutation (responsable des résistances endogènes) ou par acquisition du matériel génétique étranger (responsable des résistances exogènes). Par ailleurs, elle peut être le résultat d'une mutation génétique et d'un transfert horizontal de gènes (combinaison des deux) (GAUDY et BUXERAUD, 2005 ; BRIAND, 2009, MUYLAERT et MAINIL, 2012).

La prise excessive d'antibiotiques que ce soit par l'homme ou bien par l'animal favorise l'apparition de ce type de résistance, certes les ATB ne sont pas considérés en tant qu'agents mutagènes mais ils exercent une pression de sélection (favorisent l'émergence de germes résistants en éliminant ceux qui sont sensible) et lorsque les bactéries résistantes sont rejetées dans l'environnement elles se retrouvent en contact avec d'autres bactéries c'est ainsi que cette résistance sera transmise (mode de transmission horizontale) et gagne du terrain (VINCENT et LE BÂCLE, 2015).

3. Mécanismes d'échappement à l'action des antibiotiques

Selon BRIAND (2009), les bactéries présentent des mécanismes selon lesquels elles échappent aux ATB qui sont :

- La tolérance : elle survient chez les cocci Gram positif avec les bêta-lactamines (ATB inhibant la synthèse de la paroi), avec une CMI (concentration minimale inhibitrice) basse la bactérie paraît sensible mais la CMB (concentration minimale bactéricide ou bactériostatique) est très élevée la bactérie n'est donc pas éliminé avec un traitement normal ;
- La persistance : elle apparaît au cours d'un traitement par les bêta-lactamines où certaines bactéries de départ persistent tandis que les autres sont éliminées, les bactéries persistantes sont inactives métaboliquement ne permettant pas l'action des bêta-lactamines nécessitant des bactéries en pleine croissance ;

- La dépendance : il s'agit d'un cas extrême où la bactérie ne peut se développer qu'en présence de l'ATB.

4. Les mécanismes de résistance

Le phénomène de résistance se traduit par un ensemble de mécanismes entrepris par les bactéries à fin de neutraliser les antibiotiques, dont les principaux sont : l'inactivation enzymatique de l'antibiotique, la modification ou le remplacement de la cible de l'antimicrobien, l'efflux actif ou encore la pénétration réduite de la molécule. Il y a aussi d'autres mécanismes mais qui sont plus rares et surtout associés à certaines classes de composés, il s'agit de la protection ou la surproduction de la cible de l'antibiotique (MUYLAERT et MAINIL, 2012).

L'ensemble de ces mécanismes sont résumés dans la figure suivante :

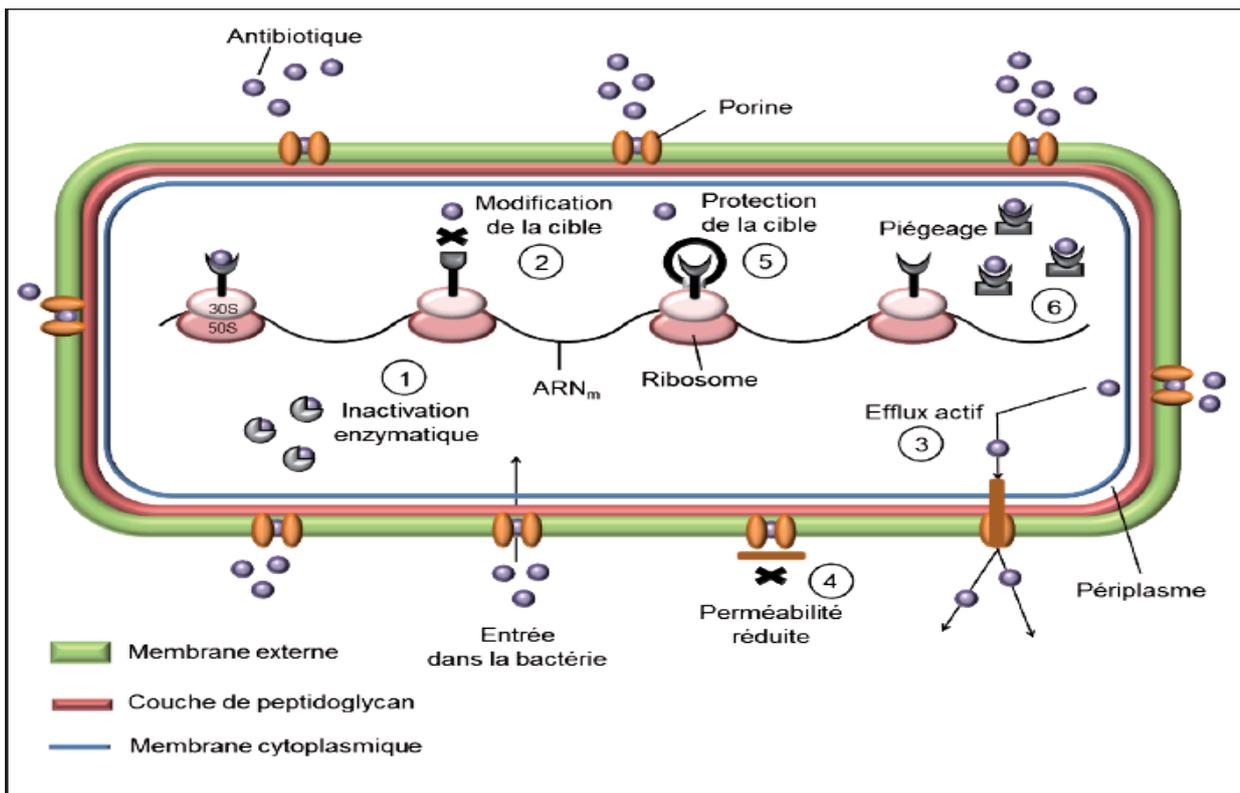


Figure 16 : Différents mécanismes de résistance aux antibiotiques développés pour les bactéries Gram négatif (MUYLAERT et MAINIL, 2012).

4.1.résistance par modification enzymatique

C'est le mécanisme de résistance le plus important que ce soit quantitativement ou qualitativement car il est concerné par beaucoup d'espèces bactérienne et de classe d'ATB. La modification enzymatique des ATB les rend inactifs et les enzymes responsables de cette modification peuvent se trouver de façon naturelle ; parmi ces enzymes on peut citer les β -lactamase qui sont dirigées contre les β -lactamines, des enzymes inactivant les aminosides... ou acquise chez les bactéries, chez cette dernières il s'agit majoritairement d'acquisition du matériel génétique par l'intermédiaire de plasmides ; on parle alors de résistance plasmidique c'est le cas par exemple des pénicillinases chez les staphylocoques , des enzymes inactivatrices des aminosides qui sont fréquemment rencontrés chez les entérobactéries. En plus de la résistance plasmidique, on peut également observer un phénomène de résistance acquise par mutation dans les gènes gouvernant la synthèse de la céphalosporinase qui est synthétisé à un niveau plus élevé provoquant l'inhibition d'un grand nombre de molécules de β -lactamines (GAUDY et BUXERAUD, 2005).

En général les réactions biochimiques catalysées par ces enzymes bactériennes peuvent être résumées comme suit : des hydrolyses, des acétylations, des phosphorylations, des nucléotidylations, des estérifications, des réductions et des réactions d'addition d'un glutathion (MUYLAERT et MAINIL, 2012).

4.2.Phénomène d'imperméabilité

Ce mécanisme est généralement rencontré chez les bactéries Gram négatif car contrairement aux bactéries Gram positif qui ne possède qu'une paroi épaisse de peptidoglycanes les bactéries Gram négatif possèdent une membrane externe qui empêche le passage de molécules hydrophobes telles que : la Pénicilline G, les macrolides et les glycopeptides (GAUDY et BUXERAUD, 2005 ; MUYLAERT et MAINIL, 2012).

La diminution de la perméabilité peut également être observée, il s'agit d'une mutation affectant la structure des porines en diminuant leur synthèse car c'est par ces dernières que l'antibiotique peut pénétrer dans la bactérie, par exemple la résistance acquise de *Pseudomonas aeruginosa* à l'imipénème qui est lié à la diminution de la production de

laporine OprD qui forme des canaux pour le passage de cet ATB (GAUDY et BUXERAUD, 2005).

En plus du rôle capital de la membrane externe dans ce type de mécanisme on trouve également le rôle de la membrane cytoplasmique des bactéries anaérobies strict et aéro-anaérobies facultatives dans le mécanisme naturel de résistance aux aminosides, car ces derniers nécessitent un mécanisme de transport actif (nécessitant de l'énergie) pour le passage à travers la membrane cytoplasmique, et l'énergie nécessaire à ce mécanisme est puisée de la chaîne respiratoire que les bactéries anaérobies strict et aéro-anaérobies facultatives ne possèdent pas donc elles présentent ainsi un mécanisme de résistance naturel aux aminosides. Dans le même contexte on peut également observer une résistance acquise par modification du système de transport de la membrane cytoplasmique, c'est le cas par exemple des mutants résistants à la fosfomycine (GAUDY et BUXERAUD, 2005 ; BABA AHMED-KAZI TANI et ARLET, 2014).

4.3. Phénomène d'efflux

L'efflux actif ou excrétion est un phénomène qui permet aux bactéries d'éliminer les ATB ou autres toxines et ainsi ce mécanisme est utilisé comme moyen de défense et de détoxification, et participe également à l'élimination des métabolites endogènes ou à la sécrétion de produits cellulaires (toxines, bactériocines, etc.) (GAUDY et BUXERAUD, 2005).

Selon AIRES (2011), ce mécanisme est assuré par des protéines transmembranaires connues sous le nom de pompes à efflux ou transporteurs actifs, les pompes à efflux bactérienne capables de transporter les antibiotiques les plus importants sont regroupées dans deux superfamilles :

- La famille des ABC (ATP-binding-cassette) transporteurs (transporteurs primaires) ;
- La famille des transporteurs utilisant le potentiel électrochimique membranaire : transporteurs secondaires de la famille des SMR (Small Multidrug Resistance), MFS (Major Facilitator Superfamily), RND (Resistance/Nodulation/cell Division), MATE (Multidrug And Toxic compound Extrusion), ce qui est montré par la figure 17.

On distingue ainsi les pompes à efflux utilisant leur énergie soit par la dissipation d'un gradient de protons (SMR, MFS, RND) ou d'ions Na^+ (MATE), soit par hydrolyse de l'ATP (ABC) (figure 17).

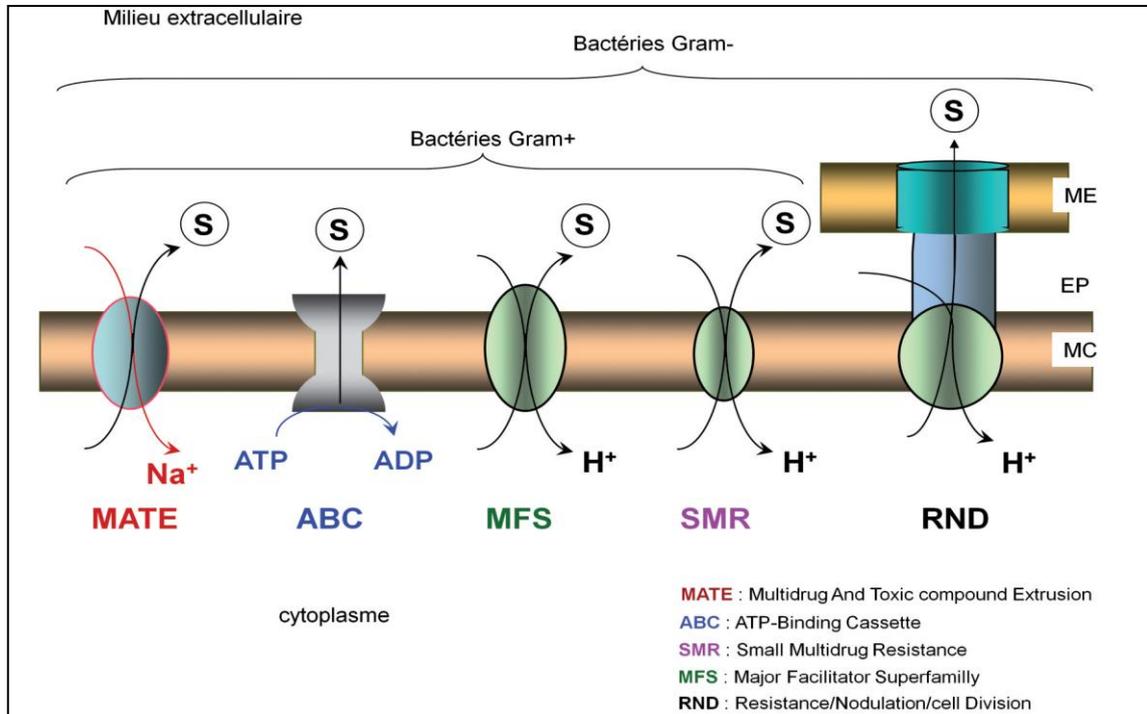


Figure 17 : Représentation schématique des cinq familles de pompes à efflux bactériennes. ME, membrane externe ; EP, espace péri-plasmique ; MC, membrane cytoplasmique ; S, substrat (AIRES, 2011).

Les pompes d'efflux présentes chez les bactéries à Gram négatif sont différentes de celles présentes chez les Gram positif, car ces dernières ne sont constituées que de transporteurs localisés dans la membrane cytoplasmique, directement responsables de l'efflux vers l'espace sous-jacent au peptidoglycane, à partir duquel les molécules peuvent diffuser vers l'extérieur. Chez les bactéries à Gram négatif, du fait de la compartimentation de la paroi, on trouve des systèmes d'efflux mettant en jeu des complexes protéiques tripartites (systèmes appartenant à la famille des RND). Du fait de cette organisation particulière, le transporteur localisé sur la membrane cytoplasmique est associé à une protéine située au niveau de la membrane externe par l'intermédiaire d'une protéine de liaison. Ces trois protéines s'assemblent pour former un canal traversant l'espace péri-plasmique et les deux membranes (figure 17) (AIRES, 2011).

Ces pompes à efflux possèdent une spécificité au substrat assez large mais juste certaines d'entre elles confèrent la résistance aux ATB par réduction de leur concentration dans cytoplasme empêchant ainsi l'ATB de se fixer sur sa cible (MESAROS *et al.*, 2005).

4.4. Défaut d'affinité

Selon GAUDY et BUXERAUD (2005), ce phénomène intervient au cours de la reconnaissance de l'ATB, dans ce cas ce mécanisme se traduit selon deux aspects :

- Une résistance naturelle avec une faible affinité de certains ATB pour les cibles ; ce qui est par exemple observé chez les bactéries Gram positif et les anaérobies strictes qui présentent une résistance à l'aztréonam car elles ont peu d'affinité pour cet ATB ;
- Une résistance acquise avec modification structurale des cibles et ainsi perte d'affinité des ATB pour ces cibles, ce mécanisme est responsable d'un grand nombre de résistances acquises dont on peut citer : la résistance des pneumocoques à la Pénicilline G après acquisition de gènes de résistance à partir d'autres pneumocoques ou streptocoques, la résistance de certaines bactéries aux quinolones qui se fait suite à une mutation au niveau du gène de l'ADN gyrase entraînant la synthèse d'une enzyme modifiée possédant moins d'affinité pour les molécules de quinolones.

4.5. Autres mécanismes

En plus des mécanismes cités précédemment d'autres mécanismes de résistances sont également observés et parmi ces mécanismes on peut citer :

- Protection de la cible de l'antibiotique : ce mécanisme est bien connu pour la famille des tétracyclines et plus récemment décrit pour les quinolones et les fluoroquinolones (RODRIGUEZ-MARTINEZ *et al.*, 2008) ;
- Piégeage de l'antibiotique : ce mécanisme se fait en augmentant la production de sa cible ou en produisant une autre molécule possédant une affinité pour ce dernier. Il en résulte une diminution de l'antibiotique à l'état libre au niveau de la cible (GUARDABASSI et COURVALIN, 2006).

5. Moyens de lutte contre l'antibiorésistance

D'après LEMAOUÏ *et al.* (2017), le phénomène de résistance bactérienne aux antibiotiques est devenu alarmant et selon l'OMS c'est devenu un problème de santé publique et une menace grave qui touche le monde entier. Pour contourner ce problème divers moyens sont suivis et parmi eux on a :

- Amélioration de la structure des anciens ATB, par exemple : la ceftaroline qui résulte de la modification chimique du céfzoprane (un ancien ATB), c'est est une molécule de la même famille des bêta-lactamines développée en 2008 (ZHANEL *et al.*, 2009) ;
- Association des ATB avec des inhibiteurs des bêta-lactamases comme l'acide calvulanique, le sulbactame et le tazobactame ;
- Association des ATB avec le sel de bismuth pour l'éradication de l'*Helicobacter pylori* qui est une bactérie multirésistante qui possède une capacité de se multiplier dans l'estomac et coloniser la muqueuse gastrique, le sel de bismuth semblerait agir en provoquant une toxicité directe sur la fonction membranaire ;
- Inhibition du transfert des plasmides ;
- Le contrôle de l'activité du riborégulateur qui est responsable du contrôle de l'activité des ribosomes impliqués dans la synthèse des protéines de résistance, par exemple un riborégulateur à base de l'aptazyme contrôle l'expression génique chez *E.coli* ;
- Utilisation des ARNs interférant, dans le but de contrôler la synthèse des protéines responsable de la résistance ;
- Utilisation des peptides antimicrobiens et des métabolites secondaires, tous les êtres vivant sont capable de synthétiser ces molécules à savoir les micro-organismes, les végétaux... dans ce concept on introduit le rôle des plantes médicinales et aromatiques vue le large spectre d'activités de leur composants à savoir celle des huiles essentielles.

En plus de ces moyens il y en a d'autre comme l'inhibition de l'ATP synthase mycobactérien, utilisation de la nanotechnologie (administration de médicaments à l'aide de nanovecteurs), la phagothérapie (utiliser des virus qui neutralisent les bactéries pathogènes par le processus de la bactériophagie. Cette méthode n'a pas abouti à des effets thérapeutiques mais pourrait être prometteuse) sont résumés dans la figure suivante :

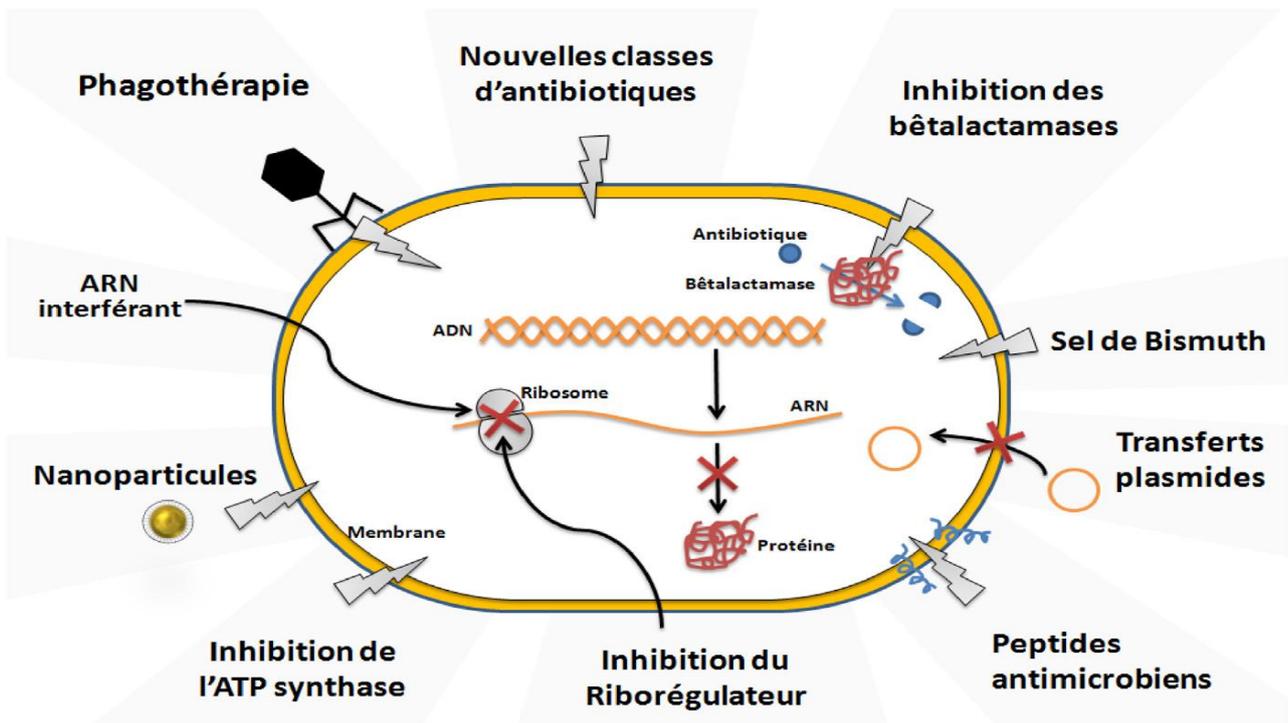
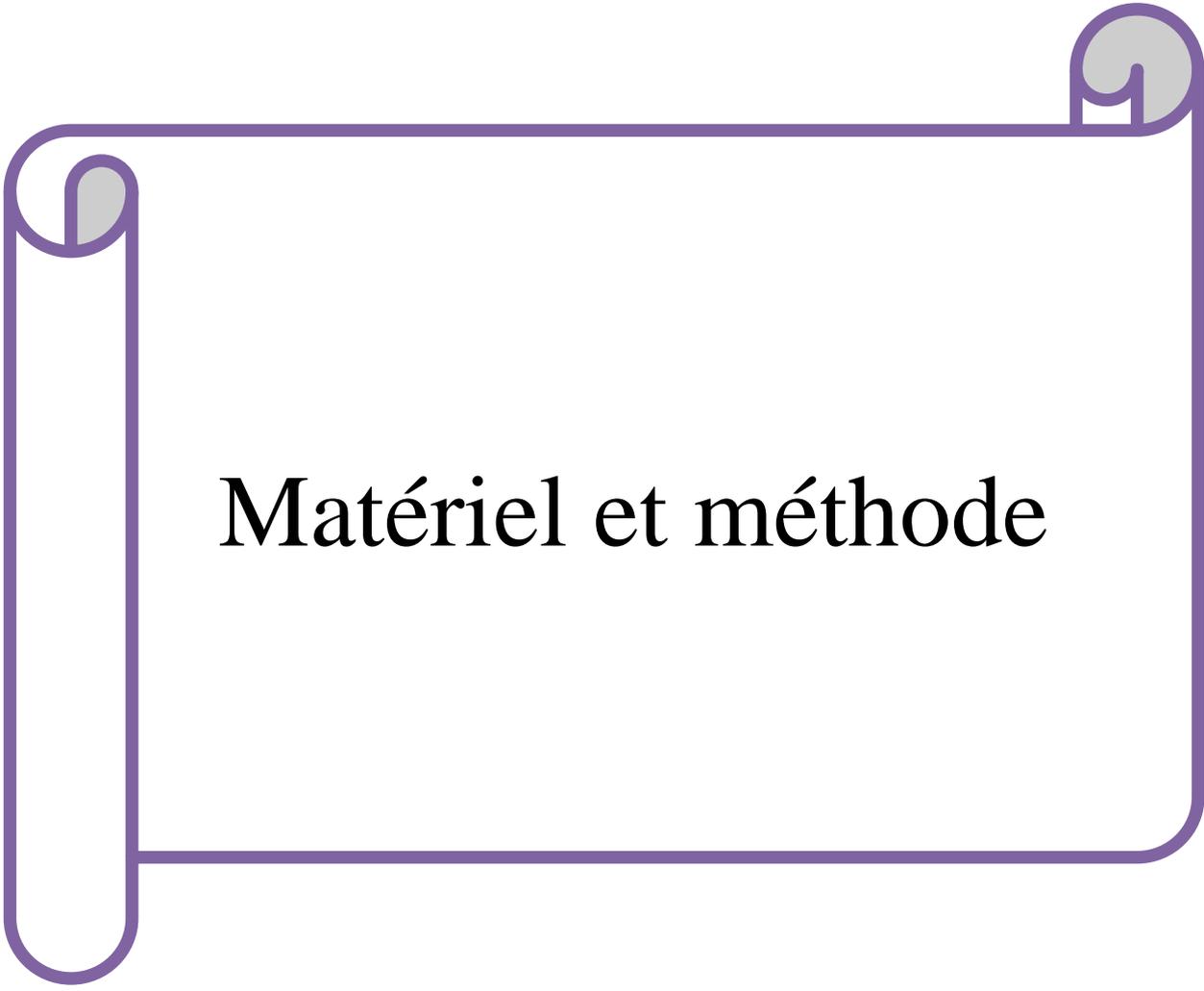


Figure 18 : Stratégies et les cibles bactériennes utilisées pour lutter contre la résistance aux antibiotiques (LEMAOUI *et al.*, 2017).



Matériel et méthode

I. Matériel et méthode

1. Matériel

1.1. Souches microbiennes testées

L'activité antibactérienne des deux huiles essentielles est testée sur des souches référenciées appartenant à l'American Type Culture Collection (ATCC), ainsi que des souches isolées au niveau hospitalier, qui sont responsables de pathologies humaines grave et connues pour leur résistance à divers agents antimicrobiens. L'ensemble des souches bactériennes sont citées dans le tableau suivant :

Tableau II : Tableau descriptif des différentes souches bactériennes utilisées pour le test de l'activité antibactérienne des deux huiles essentielles

Souches bactériennes		Type de GRAM	Provenance
Souches référenciées	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Gram positif	Laboratoire pédagogique de microbiologie de l'UMMTO
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Gram négatif	
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	Gram positif	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Gram négatif	
Souches d'origine clinique	<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram positif	Laboratoire de microbiologie du CHU de Tizi-Ouzou
	<i>Escherichia coli</i>	Gram négatif	
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Gram négatif	
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Gram négatif	

Tableau III : Tableau descriptif des deux souches fongiques utilisées pour le test de l'activité antifongique des deux huiles essentielles

Souches fongiques	Provenance
<i>Aspergillus niger</i>	Laboratoire pédagogique de microbiologie de l'UMMTO
<i>Candida albicans</i>	

1.2. Milieux de culture utilisés

L'ensemble des milieux de cultures utilisés sont cités dans le tableau qui suit, leur composition est décrite dans l'annexe I :

Tableau IV : Tableau descriptif des milieux de cultures utilisés.

Milieux de culture	Utilisation	Provenance
Gélose nutritive	Repiquage des colonies (culture et isolation de colonies non exigeantes)	HIMEDIA Inde
Gélose de Muller Hinton (MH)	Etude de la sensibilité des bactéries aux agents antimicrobiens.	laboratoire CondaPronadisa, Espagne
Milieu liquide : Brain Heart Infusion Broth (BHIB)	Revivification et enrichissement des souches bactériennes	laboratoire CondaPronadisa, Espagne
Gélose Chapman	Culture et sélection de <i>Staphylococcus aureus</i>	Matériel Médico-chirurgical (MMDEC), Tizi-Ouzou
Gélose Hecktöen	Milieu sélectif des Gram négatif	Matériel Médico-chirurgical (MMDEC), Tizi-Ouzou
Gélose King A	Culture et sélection de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Institut Pasteur, Algérie
Gélose sabouraud	Culture et repiquage des levures et champignons	Institut Pasteur, Algérie

1.3. Antibiotiques et antifongique utilisé

Le choix des antibiotiques utilisés s'est fait en fonction des souches à tester, en effet on n'utilise pas les mêmes antibiotiques pour toutes les souches bactériennes et selon leur disponibilité au niveau du laboratoire pédagogique de microbiologie, l'ensemble de ces antibiotiques ainsi que l'antifongique utilisés sont cités dans le tableau suivant :

Tableau V : Les antibiotiques et l'antifongique utilisés.

	Nom	Abréviation	Compagnie
Antibiotiques	Rifampicine	RA	Bioanalyse Inde
	Imipineme	I	
	Oxacilline	OX	
	Sulfaméthoxazole / Trimethoprime	SXT	
	Céfoxitine	FOX	
	Néomycine	N	
	Céfotaxime	CXT	
	Benzylpénicilline	P	
	Colistine	CS	
	Céfazoline	CZ	
	Ampicilline	AM	
	Antifongique	Amphotéricine B Fungizone®	

1.4. Les huiles essentielles testées

Les deux huiles essentielles étudiées nous ont été aimablement fournis par Mr OUELHADJ. Elles sont 100% pures et d'origine naturelle, issues de l'agriculture biologique. Ces deux huiles sont décrites dans le tableau suivant :

Tableau VI : Description des deux huiles essentielle testées

Huile essentielle	Nom latin	provenance	contrôle
Menthe poivré	Mentha x piperita L.	Laboratoire Pierre Fabre, France	Certifié par ECOCERT
Cyprès vert	Cupressus sempervirens L.	Laboratoire Pierre Fabre, France	Certifié par ECOCERT

1.5.Emulsifiant utilisé

L'émulsifiant utilisé c'est le Dimethyl Sulfoxide (DMSO), qui est un solvant organique polaire, miscible à l'eau et utilisé pour la dilution des huiles essentielles testées et pour avoir une meilleure diffusion des huiles dans le milieu. Le DMSO est inerte sur l'activité antimicrobienne.

1.6.Appareillage

Tableau VII : Les appareils utilisés.

Appareillage	Source
Autoclave	WEBECO. Allemagne.
Bain Marie	MEMMERT. Allemagne
Réfrigérateur	ENIEM. Algérie.
Spectrophotomètre	Vis-7220G. Biotech Engineering. Management CO.LTD (UK)
Etuve	BINDER. Allemagne.
Balance	KERN 770. Allemagne
Agitateur à barreau magnétique chauffant	GARHARDT. Allemagne

2. Méthode

2.1. Tests de confirmation microbiologiques des souches bactérienne

2.1.1. Revivification des souches dans le milieu BHIB

Les souches microbiennes testées ont été revivifiées dans un milieu de culture liquide ; le Brain Heart Infusion Broth (BHIB) et ce afin de pouvoir les utiliser, pour cela un repiquage dans des tubes contenant du BHIB a été effectué à partir des milieux de conservation des souches, ces tubes sont ensuite incubés à 37°C pendant 24h.

2.1.2. Repiquage dans un milieu sélectif

Ce repiquage sert à sélectionner les souches à tester. À partir des cultures contenues dans le BHIB, un repiquage sur les milieux sélectifs pour les souches est effectué suivit d'une incubation à 37°C pendant 24h.

2.1.3. Coloration de Gram

Après incubation des souches dans les milieux d'isolement, une coloration de Gram ainsi qu'un examen microscopique au grossissement (x1000) à immersion ont été effectués. Ceci afin de s'assurer de la pureté des souches (vérification), ainsi qu'une observation du mode de regroupement, la forme des cellules bactériennes et le type de Gram.

La coloration de Gram a été réalisée suivant le protocole décrit par DELARRAS (2007), qui est le suivant :

- Réalisation d'un frottis sur une lame en verre contenant une goutte d'eau à partir d'une colonie bactérienne isolée ;
- Dépôt de ce prélèvement au milieu de la lame en faisant des rotations ;
- Fixation du frottis soit avec de l'éthanol à 90° (5 minutes) puis on enflamme la lame ou on la passant directement 3 fois dans la flamme du bec Bunsen ;
- Coloration au violet de Gentiane (colorant basique) ou cristal violet et laisser agir pendant 30secondes à 1minute (toutes les bactéries sont colorées en violet) puis rincer à l'eau;

- Mordançage au lugol (solution iodo-iodurée) : étaler le lugol et laisser agir le même temps que le violet de gentiane puis Rincer à l'eau. Cette étape permet de stabiliser la coloration violette.
- Décoloration à l'alcool: verser goutte à goutte l'alcool sur la lame inclinée obliquement. Surveiller la décoloration (5 à 10 secondes). Le filet doit être clair à la fin de la décoloration. Rincer sous un filet d'eau ;
- Contre coloration avec de la Fuchsine ou de la Safranine: laisser agir de 30 secondes à 1 minute. Laver doucement à l'eau. Sécher au-dessus de la flamme d'un bec bunsen ;
- Observation au microscope optique à l'objectif x 100 (à immersion).

Les bactéries Gram négatif sont colorées en rose tandis que les bactéries colorées en violet sont des Gram positif.

2.2.Etude de l'activité antibactérienne des deux huiles essentielles

Depuis des millénaires, les essences sont exploitées pour leurs propriétés antiseptiques car elles s'opposent au développement des germes et les tuent. Pour cela, nous avons jugé intéressant de tester l'activité antibactérienne de deux huiles essentielles issues de : *Mentha x piperita* L. et *Cupressus sempervirens* L.

Afin de réaliser ce screening les étapes suivantes ont été suivit :

2.2.1. Préparation des pré-cultures

Pour le criblage de l'activité antibactérienne des deux huiles essentielles, on doit disposer de colonies jeunes de 18 à 24h, pour cela on procède à un repiquage à partir des tubes de BHIB contenant les souches revivifiées dans des boites de pétri contenant de la gélose nutritive.

L'ensemencement se fait par la méthode des trois cadrans, cela à fin d'obtenir des colonies bien isolées qui serviront à la standardisation de l'inoculum. Les boites de pétri sont incubées à 37°C pendant 18h préféablement et au plus tard 24h.

2.2.2. Préparation et standardisation de l'inoculum

A partir des boîtes de pétri ensemencées précédemment, on prélève une à deux colonies qu'on dissout dans un tube contenant 10 ml d'eau physiologique. La suspension bactérienne alors obtenue est ensuite standardisée à une densité optique (DO) de 0,08 à 0,1 grâce à un spectrophotomètre réglé à une longueur d'onde de 625 nm. Cette DO correspond à une concentration de 10^7 à 10^8 UFC/ml, on doit donc réaliser une dilution au 1/10 pour avoir une concentration de 10^6 UFC/ml car c'est avec cette concentration qu'on teste l'activité antimicrobienne des huiles essentielles.

2.2.3. Evaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion sur gélose

Pour le test de l'activité antimicrobienne des deux huiles essentielles on a opté pour la méthode de diffusion sur gélose en utilisant des disques de papier whatman imprégnés d'huile essentielle. Cette méthode est la plus utilisée de par sa facilité d'emploi, sa fiabilité et sa reproductibilité malgré que ces résultats soient considérés comme étant qualitatifs. Elle a été décrite par plusieurs auteurs dont : BOUSSAADA *et al.*, 2008 ; DJENANE *et al.*, 2011 ; SFEIR *et al.*, 2013.

Cette méthode communément appelée aromatogramme est réalisée comme suit :

- A l'aide d'un écouvillon stérile ensemencer chaque suspension bactérienne standardisée à 10^6 UFC/ml dans des boîtes de pétri contenant 15ml de milieu MH solidifié en s'assurant à chaque fois de bien presser l'écouvillon contre les parois du tube (pour le décharger au maximum), puis laisser sécher pendant 5 à 10minutes ;
- Imprégné un disque stérile de papier Whatman (6mm de diamètre) avec 10 à 15 μ l d'une préparation d'huile essentielle additionnée de DMSO a raison de 5% (V/V) (sert d'émulsifiant pour permettre la diffusion de l'huile dans le milieu) ;
- Laisser le disque sécher pendant quelques instant (pas trop longtemps pour éviter l'évaporation de l'HE) ;
- Déposer le disque au milieu de la boîte de pétri ;
- Mettre les boîtes de pétri à 4°C pendant 2 heures pour permettre la diffusion de l'HE dans le milieu ;
- Incuber les boîtes de pétri à 37°C pendant 24h.

Pour valider les résultats un témoin négatif est réalisé par dépôt de disques de papier whatman imprégnés de 10 μ l de DMSO au milieu des boîtes préalablementensemencées avec une suspension bactérienne standardisée, ainsi qu'un témoin positif par dépôt de 4 à 5 disques d'antibiotiques et chaque essaie est répété deux fois (sauf pour le témoin positif).

La lecture des résultats s'est faite 24 heures après l'incubation, par la mesure des diamètres des zones d'inhibition autour de chaque disque (montré par la figure 19) à l'aide d'une règle en (mm). D'après PONCE *et al.* (2003), les résultats sont exprimés en fonction du diamètre de la zone d'inhibition comme suit :

- Non sensible (-) ou résistante à l'huile essentielle si le diamètre est inférieur à 8mm ;
- Sensible (+) à l'huile essentielle si le diamètre est compris entre 9 à 14mm ;
- Très sensible (++) à l'huile essentielle si le diamètre est compris entre 15 à 19mm ;
- Extrêmement sensible (+++) à l'huile essentielle si le diamètre est supérieur 20mm.

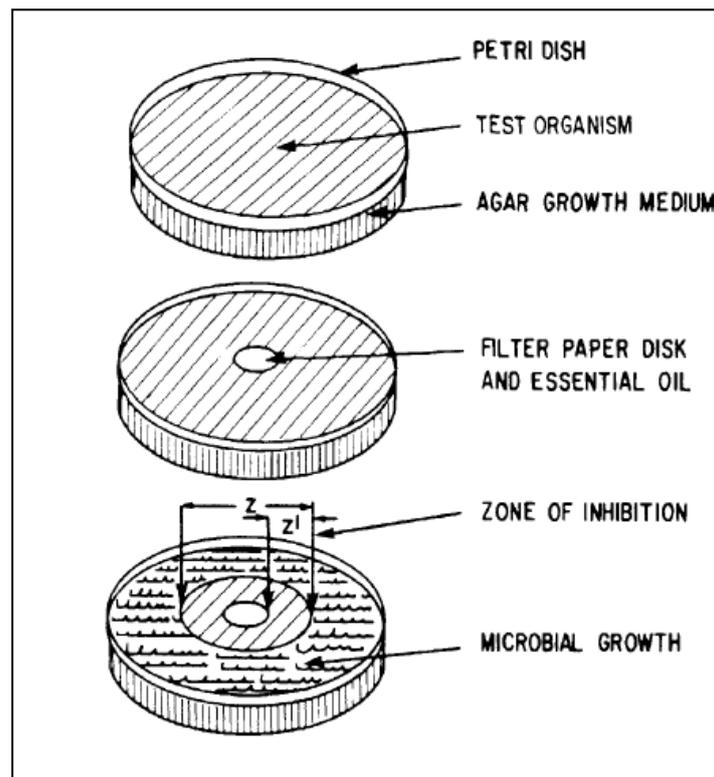


Figure 19 : Détermination de la zone d'inhibition par la méthode de diffusion des disques (ZAIKI, 1988).

2.2.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La CMI correspond à la plus faible concentration en HE capable d'inhiber en 18 à 24 heures la multiplication bactérienne (leur croissance). Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories : "sensible" ; "résistante" ; "intermédiaire".

La détermination de la CMI s'est effectuée selon la méthode des macrodilutions modifiée (adaptée aux moyens du laboratoire) décrite par GUINOISEAU (2010), qui consiste à réaliser une gamme décroissante de concentration en HE dans des tubes contenant un milieu liquide (BHIB) ainsi qu'une quantité de suspension bactérienne standardisé, cette technique s'effectue comme suit :

450 µl de l'HE à tester supplémentée en DMSO (5% V/V), sont placés dans un tube stérile contenant 3,55 ml du milieu BHIB. Ce tube correspond à la solution mère à partir de laquelle des dilutions sont réalisées. Une dilution de demi en demi est réalisée, de manière à obtenir une gamme de concentration comprise entre 63,38 et 0,12 µl/ml pour ce on a besoin de 10 tubes où à chaque fois il faut prélever 2ml d'un tube et les verser dans le tube suivant ainsi jusqu'au 10^{ème} tube, prélever 2ml et les jeter. Les valeurs de dilution sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau VIII : Valeurs des dilutions utilisées pour déterminer les CMI.

Rapport de dilution de l'H.E	Solution mère	1/2 Tube 1	1/4 Tube 2	1/8 Tube 3	1/16 Tube 4	1/32 Tube 5	1/64 Tube 6	1/128 Tube 7	1/256 Tube 8	1/512 Tube 9	1/1024 Tube 10
%	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,5	0,78	0,4	0,2	0,1
HE µl/ml	126,76	63,38	31,69	15,84	7,92	3,96	1,98	0,99	0,49	0,24	0,12

Une fois les dilutions réalisées on ajoute 10,5 µl d'un inoculum bactérien standardisé à 10⁶ UFC/ml dans chacun des tubes de la gamme de dilution ainsi que le tube contenant la solution mère. Un témoin de la croissance bactérienne (témoin positif) est réalisé par ajout de 10,5 µl de la suspension bactérienne standardisée dans un tube contenant 2ml de BHIB

supplémenté en DMSO (5% V/V). Incubation 24h à 37°C, puis observation de la présence ou l'absence de croissance bactérienne à l'œil nu.

D'après KOBA *et al.* (2004), le pouvoir inhibiteur d'une huile essentielle vis-à-vis d'une souche peut être classé comme suit :

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

Pour la réalisation de la CMI, nous avons choisi deux bactéries Gram positifs et une bactérie Gram négatif.

2.2.5. Détermination de la nature de l'activité des huiles essentielles (CMB)

La CMB est déterminée en fonction de la CMI et correspond à la concentration minimale en huile essentielle (dans notre cas) bactéricide (élimine les bactéries) ou bactériostatique (inhibe la croissance des bactéries).

Pour la détermination de la CMB la technique adaptée décrite par OUSSOU *et al.* (2004), a été suivit ; pour cela le contenu du 1^{er} tube (en allant du dernier tube c.-à-d. Tube 10) où il n'ya pas eu de croissance visible est ensemencé sur un milieu gélosé (milieu MH). Incuber ensuite à 37°C pendant 24h. L'absence du développement microbien implique l'effet bactéricide, alors que la présence de colonies (croissance bactérienne) correspond à l'effet bactériostatique. Chaque essai est répété 2 fois.

2.3. Etude de l'effet de la combinaison des deux huiles essentielles

2.3.1. Test de sensibilité de deux souches bactériennes vis-à-vis de la combinaison des deux huiles essentielles avec une proportion de : 50% de l'HE de menthe poivrée + 50% de l'HE du cyprès vert)

Cette technique est réalisée à fin de tester l'activité antimicrobienne et de voir s'il y a une éventuelle synergie entre nos deux huiles combinés sur les deux souches qui sont pour

l'une du genre *Bacillus* et l'autre *Staphylococcus*, car c'est elles qui se sont avérées les plus sensibles aux deux HEs

Ce teste consiste à mélanger à proportions égales nos deux huiles, donc 50% de l'huile essentielle de menthe poivrée et 50% de l'huile essentielle du cyprès, additionnées de DMSO en raison de 5% (V/V).

Dans une zone stérile entre deux bec bunsen, des boites de pétri sontensemencées avec des suspensions standardisées des deux souches citées ci-dessus, une fois cela fait, 15 µl de la combinaison de nos deux huiles (additionnée de DMSO à raison de 5% (V/V)) sont pipetés et déposer sur un disque de papier Whatman stérile au milieu de la boite, on ferme la boite, ensuite laisser l'huile diffusée pendant 2 heures au réfrigérateur à 4°C.

Les boites sont alors incubées à l'étuve réglée à 37°C pendant 24h et le lendemain on calcule la zone d'inhibition.

2.3.2. Test de sensibilité de deux souches bactériennes vis-à-vis de la combinaison des deux huiles avec une proportion de : 75% de l'HE de menthe poivrée + 25% de l'HE du cyprès vert)

Cette technique est réalisée dans le but de tester l'activité de nos deux huiles combinées comme citée précédemment, sauf que pour cette fois les proportions en huiles essentielles utilisées ne sont pas égales.

Pour cela 75% de l'huile essentielle de menthe poivrée et 25% de l'huile essentielle de cyprès additionnées de 5%(V/V) de DMSO sont mélangés et tester sur les mêmes souches citées précédemment.

Le protocole à suivre est le même que décrit précédemment.

2.4. Etude de l'activité antifongique des deux huiles essentielles

2.4.1. La pureté de la souche

Pour l'étude de l'activité antifongique de nos huiles essentielles on a utilisé 2 souches qui sont *Aspergillus niger* (moisissure) et *Candida albicans* (levure).

Pour s'assurer de la pureté de la moisissure *Aspergillus niger*, elle a été repiquée sur milieu Sabouraud, on effectue ensuite une identification visuelle (caractères macroscopiques) et une observation au microscope optique, donc on observe principalement :

- Les caractères macroscopique : pour déterminer les caractères morphologiques d'*Aspergillus Niger*, on a réalisé un examen visuel sur le milieu favorable des souches fongiques qui est le Sabouraud, les critères macroscopiques comme la couleur des souches, la présence ou l'absence de pigments diffusibles, la texture ont été mis en évidence ;
- Les caractères microscopiques : pour cela on effectue le prélèvement de petits fragments de la souche (spores et mycélium) en utilisant une anse stérile, le transfert des fragments sur une lame est alors réalisé, on ajoute ensuite le bleu de méthylène pour diluer.

On réalise alors l'observation de nos fragments au grossissement G x 400, ce type d'identification est fondé essentiellement pour l'étude morphologique des spores et du mycélium.

2.4.2. Préparation de la suspension fongique

La préparation de la suspension fongique se fait à partir des boites où on a repiqué nos souches. Dans le cas d'*Aspergillus Niger*, on prélève des spores dans 10ml d'eau physiologique, on réalise ensuite un comptage des spores sur la cellule de Malassez.

On standardise alors la suspension à 10^6 spores/ml, puis on prélève 150 μ l de notre suspension à l'aide d'une pipette pasteur, qu'on étale ensuite sur milieu Sabouraud à l'aide d'un râteau, les boites sont alors incubées à 37°C pendant 72h.

Pour ce qui est de *Candida albicans*, on réalise une suspension de la levure dans 10 ml d'eau physiologique, qu'on standardise par spectrophotomètre à une longueur d'onde de 625nm pour l'obtention d'une suspension de 10^6 UFC/ml correspondant à une D.O comprise entre 0,08 et 0,1.

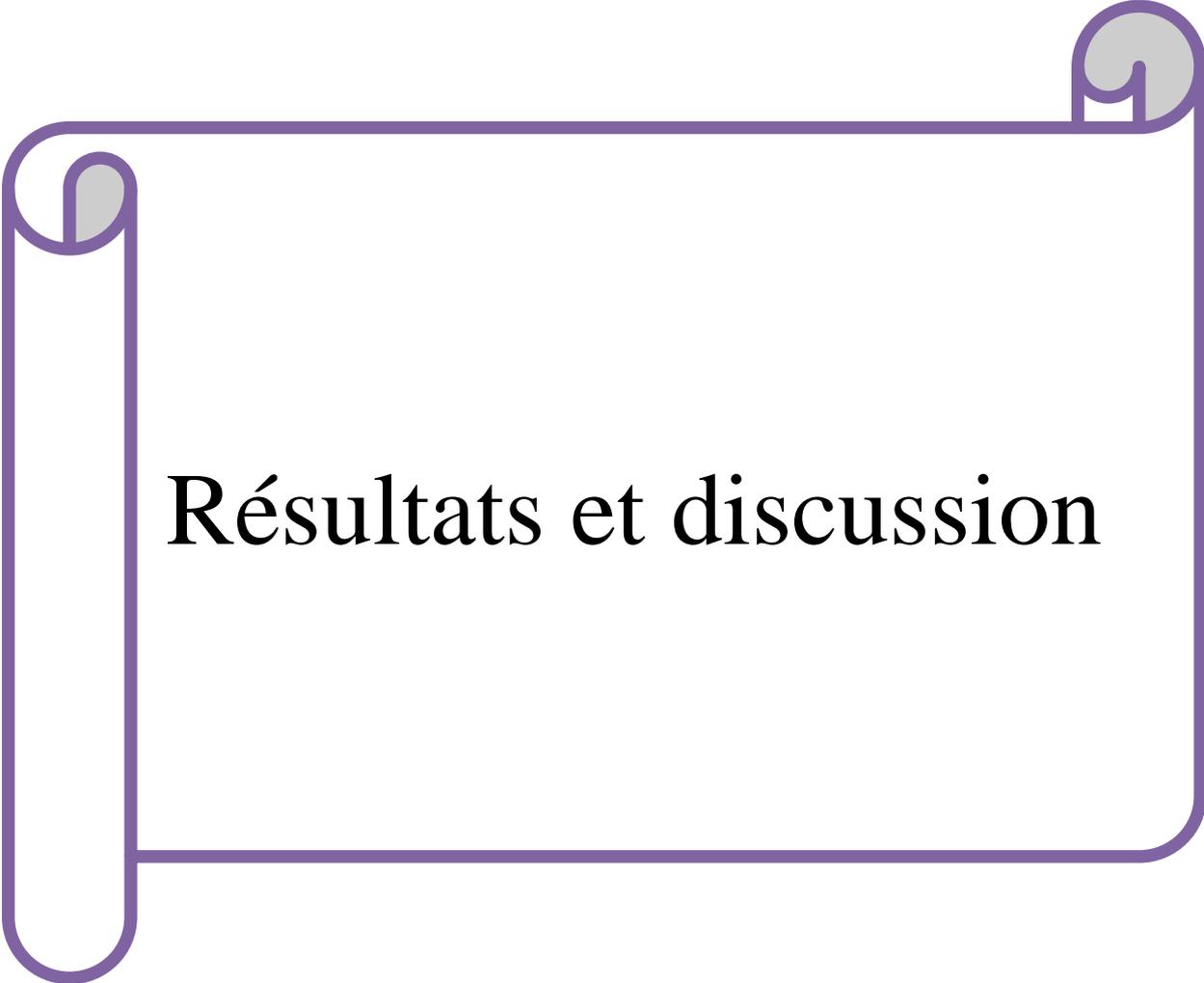
2.4.3. Activité antifongique des huiles essentielles

La technique utilisée afin de déterminer l'activité antifongique c'est la même utilisée pour l'évaluation de l'activité antibactérienne, il s'agit de la méthode de diffusion des disques sur gélose, et ce en utilisant des disques stériles en papier Whatman de 6 mm de diamètre.

Chacune de nos deux huiles essentielles est additionnée de 5% (V/V) de DMSO (Diméthyle Sulfoxyde) et ce pour permettre une meilleure diffusion des huiles.

Dans une zone stérile entre deux bec bunsen, on pipete 15µl de chacune des préparation (huiles essentielle+ DMSO) pour imbiber un disque de papier whatman, on laisse sécher pendant quelques secondes puis on pose le disque au milieu de la boîte de pétri qu'on a préalablement ensemencée avec notre suspension standardisée à l'aide d'un écouvillon pour *Candida albicans* et une pipettes pasteur (râteau) pour *Aspergillus niger* ; on ferme les boîtes de pétri et les incube à 37°C pendant 72h ou plus, en s'assurant de bien les scellées avec du para-film afin d'éviter les contaminations, en ce qui concerne *Candida albicans* on l'incube à 28°C pendant 72h.

Pour le témoin positif on imbibe un disque Whatman avec de l'Amphotéricine B (qui est un antifongique), quant au témoin négatif on imbibe le disque de papier Whattman avec du DMSO. La lecture se fait après incubation en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'une règle, les mesures sont prises en millimètre, les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition.



Résultats et discussion

II. Résultats et discussion

1. Résultats des tests de vérification des souches bactériennes

Les caractères morphologiques des souches étudiées observés après coloration de Gram sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau IX : Caractères morphologiques des souches bactériennes étudiées.

Souches bactériennes		Milieu de culture	Type de Gram	Aspect microscopique
Souches référenciées	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Gélose chapman	Gram positif	Cocci en grappe de raisin
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Gélose Hecktöen	Gram négatif	Coccobacilles
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	Gélose nutritive	Gram positif	Bacilles
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Gélose nutritive King A	Gram négatif	Bacilles
Souches d'origine clinique	<i>Staphylococcus aureus</i>	Gélose Chapman	Gram positif	Cocci en grappe de raisin
	<i>Escherichia coli</i>	Gélose Hecktöen	Gram négatif	Coccobacilles
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Gélose Hecktöen	Gram négatif	Bacilles
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Gélose Hecktöen	Gram négatif	Coccobacilles

La souche *Bacillus cereus* ATCC 10876 nous a été fournis pure dans son milieu sélectif donc on a juste effectué une coloration de Gram pour la certitude.

2. Résultats des témoins réalisés par la méthode de diffusion sur gélose

2.1. Résultats des témoins négatifs réalisés avec le DMSO

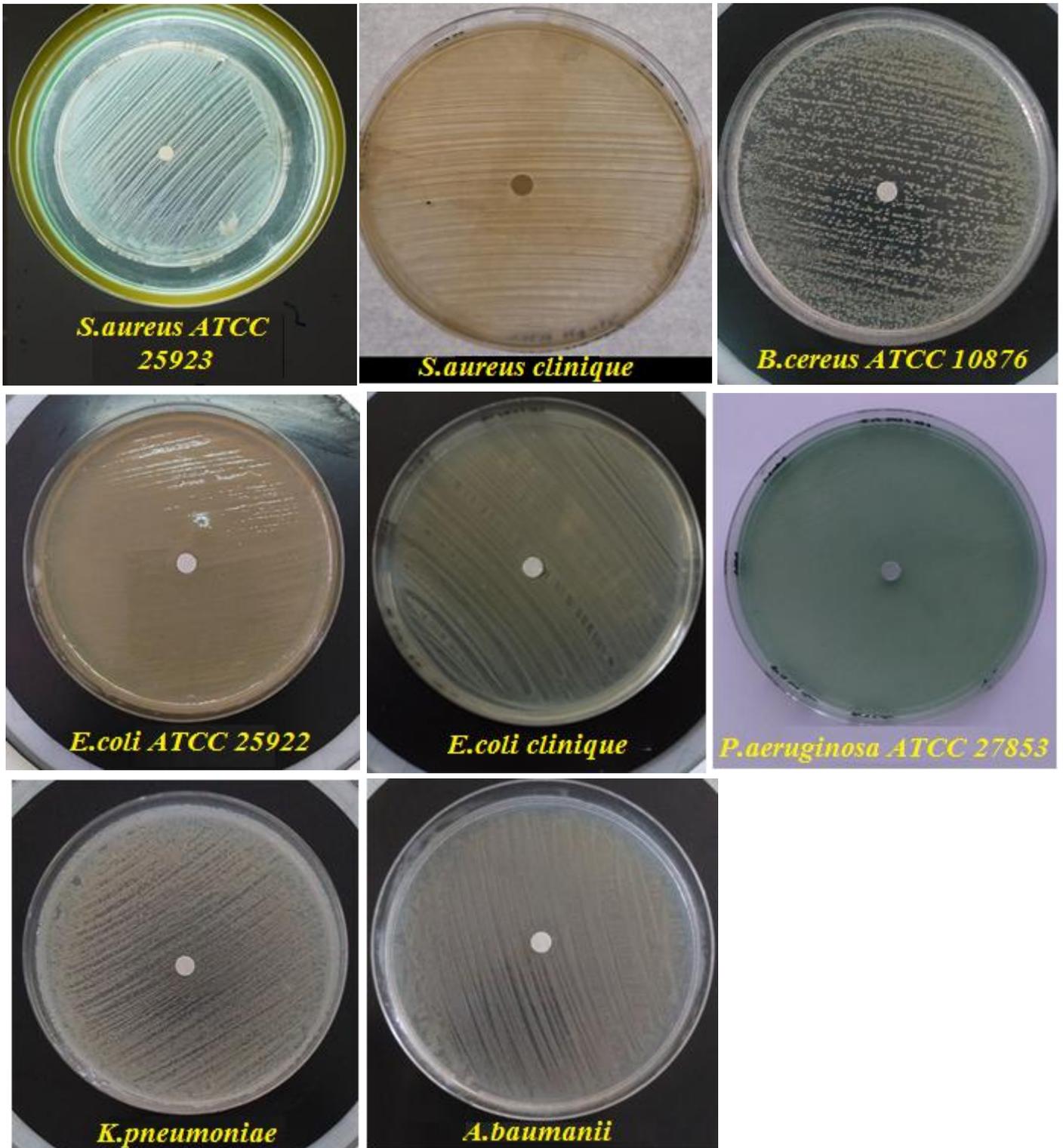


Figure 20 : Photographies des témoins négatifs des souches référencées et pathogènes testées pour l'activité antibactérienne des deux HEs.

A partir de la figure ci-dessus on déduit que le DMSO n'a pas d'effet antimicrobien sur les souches testées donc ce dernier est bien inerte vis-à-vis de cette activité.

2.2.Résultats des témoins positifs (antibiogramme)

L'antibiogramme est réalisé dans le but de tester la sensibilité ou la résistance des souches bactériennes vis-à-vis des antibiotiques (témoin positif), il est communément utilisé dans le milieu hospitalier donc le choix des ATB testés est basé sur la fréquence de leur utilisation et en fonction de la souche bactérienne. La figure suivante résume l'ensemble des témoins positifs :

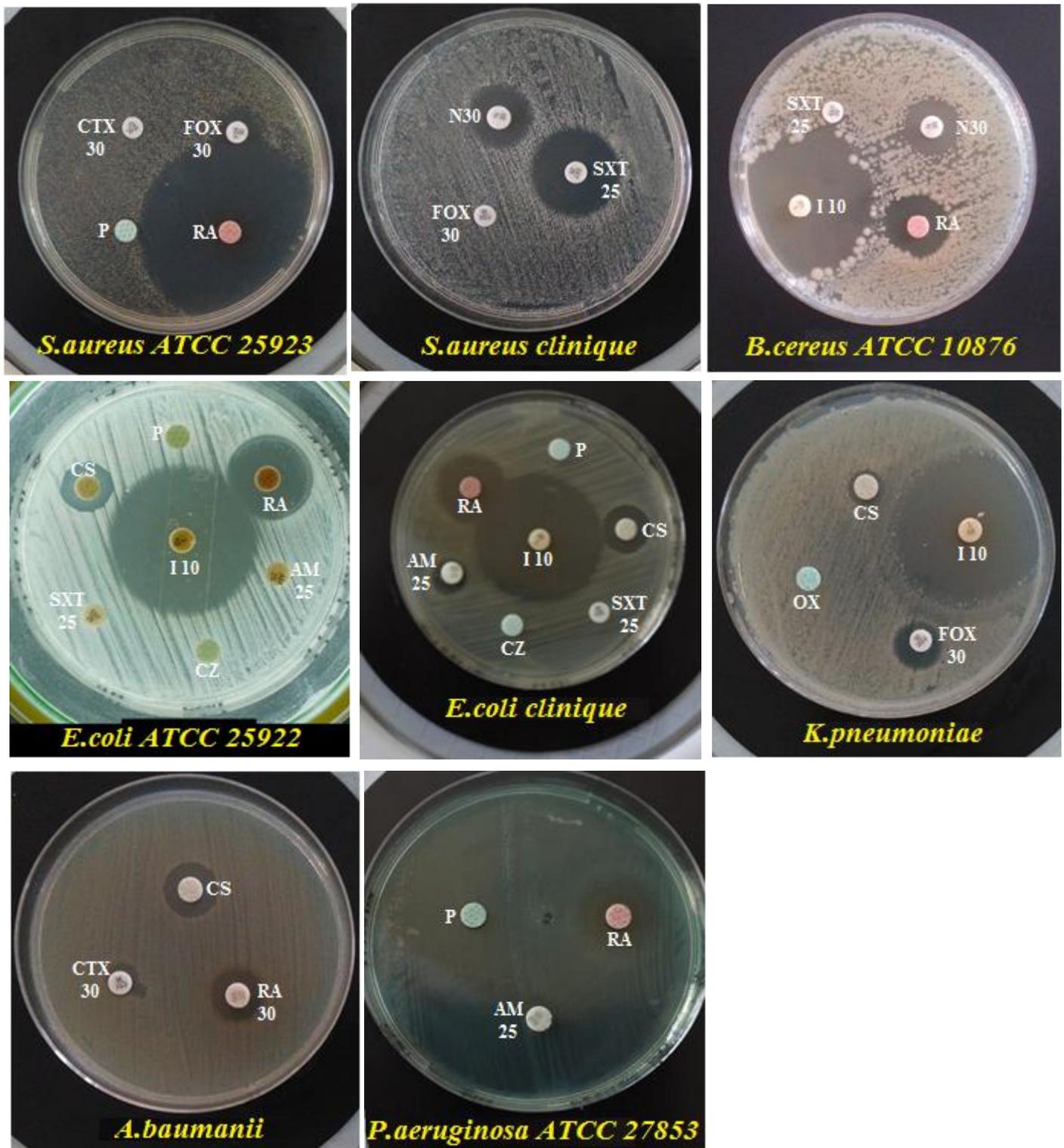


Figure 21 : Photographies des témoins positifs des souches référenciées et pathogènes testées vis-à-vis des antibiotiques utilisés : Céfoxitine (Fox 30), Imipenème (I10), Rifampicine (RA), Oxacilline (OX), Sulfaméthoxazole / Triméthoprime (SXT 25), Néomycine (N30), Céfotaxime (CTX 30), Benzylpénicilline (P), Colistine (CS), Céfazoline (CZ), Ampicilline (AM 25).

Les diamètres d'inhibition ainsi que la sensibilité ou résistance des souches bactériennes vis-à-vis des ATB utilisés sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau X : Tableau récapitulatifs des zones d'inhibition des témoins positifs (en mm).

	Souche bactériennes	Les antibiotiques utilisés et le diamètre des zones d'inhibition en mm										
		RA	I	SXT	N	FOX	CTX	P	CS	CZ	AM	OX
souches référencées	E.coli ATCC 25922	22	38	6	NT	NT	NT	6	14	6	6	NT
	S.aureus ATCC 25923	54	60	40	27	14	6	6	NT	NT	NT	NT
	Bacillus Cereus ATCC10876	20	40	6	17	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	P.aeruginosa ATCC 27853	18	35	NT	NT	NT	NT	6	14	NT	6	NT
Souches d'origine cliniques	E.coli	20	40	6	NT	NT	NT	6	14	6	10	NT
	S.aureus	49	34	25	16	6	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	K.pneumoniae	20	40	23	NT	10	NT	NT	07	NT	NT	6
	Acinétobacter baumannii	13	NT	NT	NT	NT	9	NT	14	NT	NT	NT

NT : non-testé

6 : diamètre du disque d'ATB

Les diamètres des disques (6mm) sont inclus dans les mesures des zones d'inhibition.

D'après le tableau IX et la figure 21 on constate que la résistance ou la sensibilité des souches aux ATB diffèrent et ce en fonction de la souche et de l'ATB utilisé ; par exemple : *E.coli ATCC 25922* est extrêmement sensible à l'Imipineme et la Rifampicine, sensible à la Colistine mais résistante aux ATB suivants : Sulfaméthoxazole / Trimethoprime, Céfazoline et Benzylpénicilline.

Mais de façon général, on remarque que presque toutes les souches sont sensibles à l'Imipineme et la Rifampicine et résistantes à la Benzylpénicilline.

3. Résultats du test de sensibilité des souches bactériennes aux deux huiles essentielles

3.1. Résultats du test de sensibilité des souches bactériennes à l'H.E de *Mentha x piperita* L.

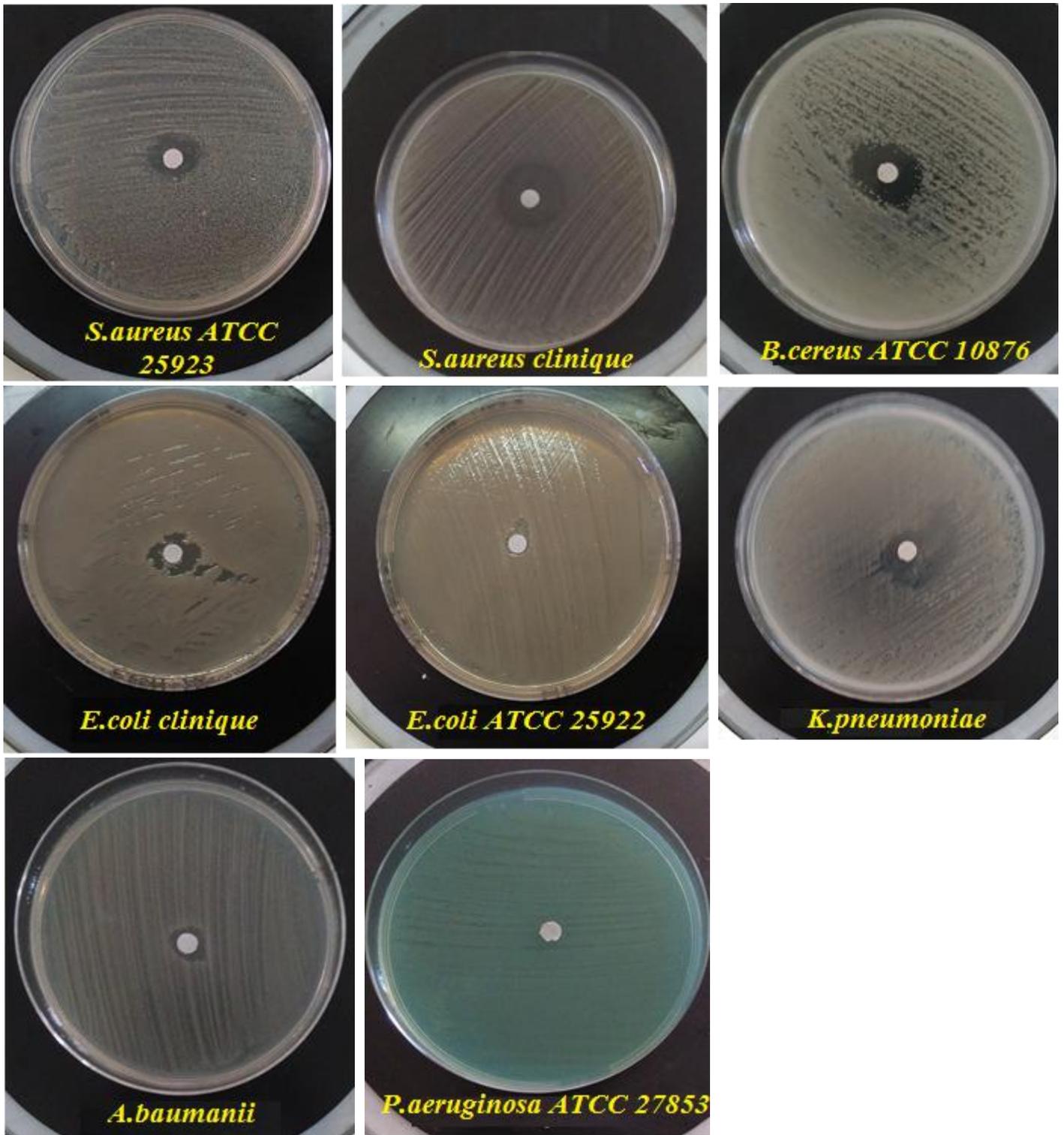


Figure 22 : Photographies des tests de sensibilités des souches bactériennes vis-à-vis de l'huile essentielle de *Mentha x piperita* L.

Le diamètre des zones d'inhibition ainsi que la sensibilité des souches bactérienne vis-à-vis de l'huile essentielle de la menthe poivrée sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau XI: Résultats des diamètres d'inhibition en mm (moyenne \pm l'écart type) de l'activité antibactérienne de l'H.E de *Mentha x piperita* L.

<i>Mentha x piperita</i> L.			
Souches bactériennes		Diamètres d'inhibition (mm) en moyenne des deux essais \pm l'écart type	Sensibilité
Souches référenciées	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	10 \pm 0,00	+
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	12,5 \pm 3,54	+
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	20 \pm 0,00	+++
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	6 \pm 0,00	-
Souches cliniques	<i>Staphylococcus aureus</i>	25,5 \pm 4,95	+++
	<i>Escherichia coli</i>	13 \pm 0,00	+
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	12 \pm 0,00	+
	<i>Klebsiella pneumpniae</i>	13,5 \pm 4,95	+

Les diamètres des disques (6 mm) sont inclus dans les mesures des zones d'inhibition.

D'après la figure 22 et le tableau ci-dessus on constate que l'HE de la menthe poivrée possède un fort pouvoir antibactérien contre *Bacillus cereus* ATCC 10876 et *Staphylococcus aureus* d'origine clinique, ainsi qu'une activité moyenne pour les autres souches à part *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 qui s'est avérée résistante.

3.2.Résultats du test de sensibilité des souches bactériennes à l'H.E de *Cupressus sempervirens* L.

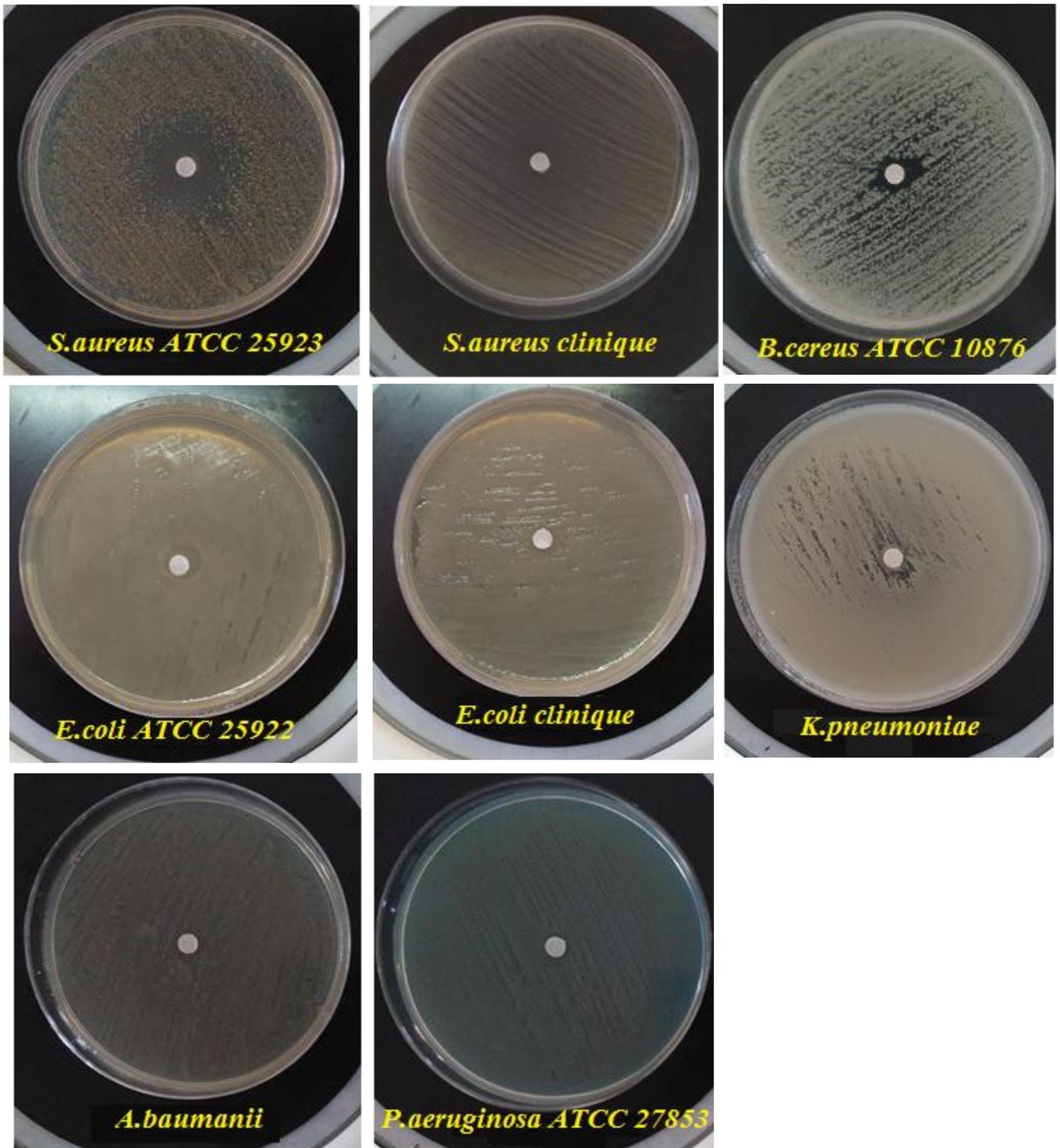


Figure 23 : Photographies des tests de sensibilités des souches bactériennes vis-à-vis de l'huile essentielle de *Cupressus sempervirens* L.

Les diamètres des zones d'inhibition ainsi que la sensibilité des souches bactérienne vis-à-vis de l'huile essentielle du cyprès vert sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau XII : Résultats des diamètres d'inhibition en mm (moyenne \pm l'écart type) de l'activité antibactérienne de l'HE de *Cupressus sempervirens* L.

<i>Cupressus sempervirens</i> L.			
Souches bactériennes		Diamètres d'inhibition (mm) en moyenne des deux essais \pm l'écart type	Sensibilité
Souches référenciées	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	11 \pm 0,00	+
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	21 \pm 1,41	+++
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	9 \pm 1,41	+
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	6 \pm 0,00	-
Souches cliniques	<i>Staphylococcus aureus</i>	15 \pm 5,66	++
	<i>Escherichia coli</i>	6 \pm 0,00	-
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	9,5 \pm 0,70	+
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	9 \pm 1,41	+

Les diamètres des disques (6 mm) sont inclus dans les mesures des zones d'inhibition.

D'après la figure 23 et les résultats du tableau ci-dessus on remarque que l'HE de *Cupressus sempervirens* L. possède une forte activité antimicrobienne vis-à-vis de

Staphylococcus aureus ATCC 25923 mais une activité faible a moyenne pour les autres souches à part *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Escherichia coli* qui se sont avérées résistante a cette HE.

Les résultats de l'activité antibactérienne des deux huiles essentielles sont résumés dans l'histogramme de la figure 24.

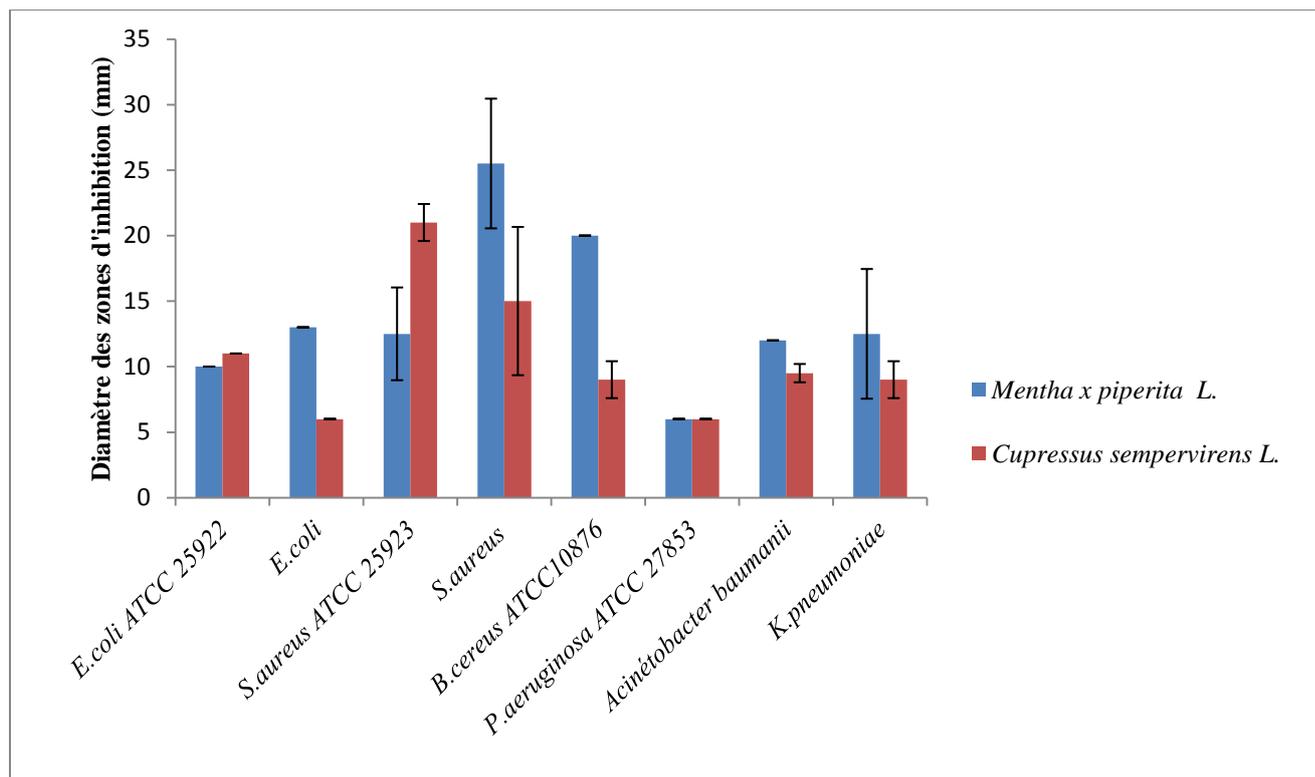


Figure 24 : Représentation graphique du test de sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis des deux huiles essentielles testés ; *Mentha x piperita* L. et *Cupressus sempervirens* L.

D'après l'histogramme de la figure 24, on constate que les deux huiles essentielles présentent une activité antibactérienne vis-à-vis des souches testées à part *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 qui est résistante aux deux HEs vue qu'elle n'a présenté aucun diamètre d'inhibition et *Escherichia coli* d'origine clinique qui s'est avérée résistante à l'huile essentielle de *Cupressus sempervirens* L.

Le pouvoir antimicrobien des deux HEs varie en fonction des souches testées. en effet, *S. aureus* d'origine clinique qui est une bactérie Gram positif et qui présente une résistance à 3 antibiotiques (FOX, P et CTX) est extrêmement sensible à l'HE de la menthe poivrée avec un diamètre d'inhibition de 25,5mm, alors qu'elle est très sensible à l'HE du cyprès (15mm). *Bacillus Cereus ATCC10876* qui est également une bactérie Gram positif est très sensible à l'HE de la menthe poivrée avec un diamètre d'inhibition de 20mm par contre elle est juste sensible à l'HE du cyprès (9 mm).

S.aureus ATCC 25923 est extrêmement sensible à l'HE du cyprès mais juste sensible à celle de la menthe poivrée, en ce qui concerne les autres souches Gram négatif qu'elles soient référenciées ou d'origine clinique elles sont juste sensible vis-à-vis des deux huiles (à part *E.coli* qui est résistante à l'HE du cyprès) mais leur sensibilité à l'huile essentielle de la menthe poivrée est plus importante que celle du cyprès ; car *E.coli* d'origine clinique présente un diamètre d'inhibition de 13,5mm en présence de la menthe poivrée par contre elle est résistante à l'HE du cyprès vue qu'aucune zone d'inhibition n'a été signalée, *Acinétobacter baumannii* est sensible à l'HE de menthe poivrée avec un diamètre de 12mm par contre avec l'HE du cyprès ce diamètre est de 9,5mm et *K.pneumoniae* présente un diamètre de 13,5mm avec l'HE de la menthe poivrée par contre se diamètre diminue en présence de l'HE du cyprès atteignant 9mm. *Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853* est la seule qui est résistante aux deux HEs à la fois.

On constate alors, que les bactéries Gram négatif présentent une sensibilité moindre aux HEs que les bactéries Gram positif. En effet selon BENCHEQROUN (2012), La résistance des Gram négatif est attribuée à leur membrane externe hydrophile qui peut bloquer la pénétration des composés hydrophobes dans la membrane cellulaire cible. Par contre selon DORMAN et DEANS (2002), la susceptibilité des bactéries envers les huiles essentielles ainsi que le type de leur Gram, ne semble avoir qu'une petite influence sur l'inhibition de la croissance microbienne.

De façon générale, on remarque d'une part que les deux HEs ont une activité antimicrobienne moyenne et quelque fois importante. D'une autre part le pouvoir antibactérien de l'HE de la menthe poivrée est plus important que celui du cyprès.

D'après l'analyse de la variance (annexe II) les résultats sont hautement significatifs vu que (p -value $<0,05$). On déduit donc que l'activité antibactérienne qu'exerce les des deux HES vis-à-vis des mêmes souches bactériennes est différente et cela peut s'expliquer du fait que nos deux huiles proviennent de deux plantes de familles botaniques différentes ce qui conduit à une hétérogénéité dans leur composition chimique et ainsi ils agissent différemment, ainsi d'après le test de Newman Keuls (annexe II) nos souches bactériennes sont classées en 4 groupes homogènes (des bactéries résistantes, sensible, très sensible et extrêmement sensible).

Selon les travaux de SINGH *et al.* (2015), les bactéries Gram positif (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Streptococcus pyogenes* ATCC19615) sont plus sensible à l'HE de la menthe poivrée que les bactéries Gram négatif (*Escherichia coli* ATCC 25922 et *Klebsiella pneumonia* ATCC 13883) testées. En effet, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 est plus sensible à cette HE avec un diamètre de 17,2 mm qu'*Escherichia coli* ATCC 25922 qui présente une sensibilité moindre avec un diamètre d'inhibition de 5,1mm, donc l'HE de la menthe poivrée est plus efficace contre les bactéries Gram positif que les bactéries Gram négatif. Nos résultats concordent avec ces travaux mis à part quelques différences moindres dans les diamètres des zones d'inhibition.

Cela dit l'évaluation de l'activité antibactérienne de l'HE extraite des feuilles de la menthe poivrée provenant d'Oman effectuée par HOSSAIN et SATMI (2016), a démontré que le pouvoir antibactérien de cette HE est plus important chez *E.coli* avec un diamètre d'inhibition pouvant atteindre 14mm, alors que chez *S.aureus* le diamètre n'est que de 10mm.

D'après SCHELZ *et al.* (2006), qui ont évalué l'activité antimicrobienne et antiplasmidique de plusieurs HES dont la menthe poivrée ont révélé que l'HE de menthe poivrée présente une forte activité contre *Escherichia coli* F'lac K12 LE140 avec un diamètre d'inhibition de 23mm par contre *Staphylococcus epidermidis* isolé du milieu hospitalier est elle aussi très sensible à l'HE de la menthe poivrée mais avec un diamètre d'inhibition moins important qui est de 15mm.

Selon HOSSAIN et SATMI (2016), L'huile essentielle de la menthe poivrée contient un mélange de composés, constitué principalement de mono et de sesquiterpène oxygénés ainsi que les hydrocarbures et leurs dérivés, présentant une puissante activité biologique. Et d'après

DE SOUSA GUEDES (2016), le constituant principal de l'HE de la menthe poivrée est le menthol avec une proportion de 59,73%, à côté de ce constituant principal d'autres composés sont détectés tels que néomenthol, pulegone, isopulegol et pipéritone qui ont démontré des effets inhibiteurs contre une variété de bactéries pathogènes. D'après SCHELZ *et al.* (2006), ces effets antimicrobiens sont dus à une perturbation de la fraction lipidique de la membrane cytoplasmique microbienne qui induit des altérations de la perméabilité et de la diffusion des matériaux intracellulaires.

Selon MAZARI *et al.* (2010), l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'HE du *Cupressus sempervirens* L. isolée d'Algérie contre 5 souches bactériennes référenciées dont 3 Gram-positives (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus cereus* ATCC 11778) et 2 Gram-négatif (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) a démontré que cette HE inhibe la croissance de ces bactéries avec un diamètre de 10,3mm pour *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, 9mm pour *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 et 7,6mm pour *Bacillus cereus* ATCC 11778. En ce qui concerne les bactéries Gram négatif, elles présentent également une sensibilité moyenne vis-à-vis de cette HE car elles ont respectivement des diamètres d'inhibition de 9,6 mm et 6,8mm.

Les résultats de cette étude concordent avec les nôtre, vu que cette HE possède un moyen effet antibactérien. Sauf pour *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 car dans notre cas le diamètre d'inhibition est plus important, ainsi que pour *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 qui s'était avéré résistante lors de notre étude.

Le dépistage de l'effet antibactérien d'une variété d'HE dont le cyprès vert réalisé par FABIO *et al.* (2007), a démontré que l'HE de *Cupressus sempervirens* L. possède un effet inhibiteur moyen conte *Streptococcus pyogenes* (2mm), *Streptococcus pneumoniae* (5mm) et *Klebsiella pneumoniae* (3mm) et un très bon effet contre *Streptococcus agalactiae* (15mm), par contre *Staphylococcus aureus* s'est avérée résistante à cette HE. Ces résultats concordent avec les nôtre sauf pour *S.aureus*.

L'étude réalisée par SELIM *et al.* (2014) sur l'activité antimicrobienne et antibiofilm des extraits méthanoliques et de l'HE du cyprès méditerranéen (*Cupressus sempervirens* L.) a démontré que l'HE du cyprès vert possède une faible activité antimicrobienne (*in vitro*)

contre toutes les bactéries testées, y compris les bactéries Gram positif et Gram négatif avec des diamètres d'inhibition de 4 à 7mm et il ya beaucoup de bactéries résistantes à cette HE parmi elles on a : *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*. Ce qui confirme aussi nos résultats sauf pour *Bacillus cereus*, laquelle a présenté un diamètre d'inhibition de 9,1mm lors de notre étude.

L'HE du cyprès vert est constituée majoritairement d'Hydrocarbures monoterpéniques (72,9 à 75,7%), avec α -pinène en tant que constituant principal (34,5 à 60,5%) et le cédrol (8,3%) a été jugé le deuxième constituant plus important. (YANI *et al.*, 1983 ; MAZARI *et al.*, 2010).

Vu que l'HE du cyprès est riche en α -pinène et que dans la majorité des cas cette HE ne présente pas de pouvoir antibactérien puissant, nous pouvons donc supposer que l' α -pinène ne présente aucun pouvoir antibactérien.

Ceci a déjà été confirmé par les travaux de CHERAIF *et al.* (2007), dont l'étude a démontré que les huiles essentielles de *Cupressus arizonica* Greene, riches en α -pinène (feuilles (20,0%), branches (5 8,6%), cônes (60,5%)), possèdent une faible activité vis-à-vis de différentes souches bactériennes, à savoir : *E.coli*, *S.aureus*, *K.pneumoniae*, *S.typhimurium*, *E.faecalis*, et *S.pneumoniae*, avec des diamètres de zones d'inhibition variant entre 8 et 17 mm.

L'étude réalisée par DE BILLERBECK (2007), sur l'activité antibactérienne d'un ensemble d'HE dont la menthe poivrée et le cyprès vert sur des bactéries multi-résistantes a révélé que *S.aureus* est sensible à l'HE du cyprès avec un diamètre d'inhibition de 15mm et que *Pseudomonas aeruginosa* est résistante à cette HE. Quant à l'HE de la menthe poivrée, elle est extrêmement active contre *S.aureus* avec un diamètre d'inhibition supérieur à 40mm, mais *Pseudomonas aeruginosa* est juste sensible à cette HE.

La différence entre les résultats de ces études entre elles d'une part et avec les résultats de notre étude d'une autre part peut être due soit à la différence entre les souches testées ou bien à la l'hétérogénéité de la composition chimique de l'HE, en effet la composition de cette dernière peut varier en fonction des emplacements géographiques, de l'environnement, degré

d'ensoleillement (lumière)..., car d'après OUSSALAH *et al.* (2006), l'activité biologique d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique, les groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, aldéhydes) et les effets synergiques entre les composants. Ainsi les composés chimiques les plus efficaces et qui possèdent un large spectre d'action antimicrobienne sont les phénols (thymol, carvacrol et eugénol) qui exercent un effet inhibiteur et létal vis-à-vis de plusieurs souche bactériennes comme *E.coli* et *S. aureus* sur lesquelles ils provoquent des fuites d'ions potassium, par contre ils ne sont pas actifs sur *Pseudomonas aeruginosa*, les alcools (α -terpinéol, terpinen-4-ol, menthol, géraniol, linalol), les aldéhydes (géraniol, citral et néral) et les cétones (carvone, pulégone et camphre) (ZHIRI, 2006).

4. Concentrations minimales inhibitrices (CMI)

A partir de l'étude préliminaire de l'activité antibactérienne des deux HEs par la méthode de diffusion sur gélose, on a pu déterminer les souches bactériennes les plus sensibles aux deux HEs. Pour lesquelles la CMI a été déterminé car pour une éventuelle utilisation de ces HEs que soit en industrie pharmaceutique ou autre cette concentration doit être déterminé et avec de faible valeurs pour éviter les effets toxiques des HEs.

4.1.Résultats de la mesure des CMI de *Mentha x piperita* L.

La concentration minimale inhibitrice de l'huile essentielle de *Mentha x piperita* L a été déterminée sur les souches suivantes : *Bacillus cereus* ATCC 10876 et *Escherichia coli* Les concentrations utilisées vont de 0,12 à 63,38 μ l d'H.E/ml, ce qui est montrés dans les figures présentes dans l'annexe

On a constaté que la concentration minimale inhibitrice de l'HE de la menthe poivrée sur *Bacillus cereus* ATCC 10876 qui est contenue dans le tube 3 est de 15,84 μ l/ml donc selon KOBA *et al.* (2004), ce pouvoir inhibiteur est excellent (CMI <50 μ l/ml).

On a remarqué que la concentration minimale inhibitrice de l'HE de la menthe poivrée sur *Escherichia coli* d'origine clinique qui est contenue dans le tube 6 est de 1,98 μ l/ml donc selon KOBA *et al.* (2004), ce pouvoir inhibiteur est excellent (CMI <50 μ l/ml).

4.2. Résultats de la CMI de *Cupressus sempervirens* L.

La concentration minimale inhibitrice de l'huile essentielle de *Cupressus sempervirens* L. a été déterminée sur *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (figure 27). Les concentrations utilisées vont de 0,12 à 63,38µl d'H.E/ml.

On a constaté que la concentration minimale inhibitrice de l'HE du cyprès sur *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 qui est contenue dans le tube de la solution mère est de 126,76 µl/ml donc selon KOBA *et al.* (2004), ce pouvoir inhibiteur est intéressant (50 µl/ml <CMI < 250µl/ml).

5. Résultats de la nature de l'activité des deux huiles essentielles (CMB)

5.1. Résultats des CMB de *Mentha x piperita* L.

La nature de l'activité antibactérienne de *Mentha x piperita* L. sur les souches testées est révélée par un repiquage à partir du 1^{er} tube de la CMI où il n'y a pas eu de croissance bactérienne visible (en allant du dernier tube), sur des boîtes de Pétri, en ensemençant la totalité de la boîte et incubé à 37°C pendant 24h.

L'activité de l'HE de menthe poivrée sur la souche *Bacillus cereus* ATCC 10876 est montrée par la figure suivante :



Figure 25 : Résultat d'ensemencement d'un échantillon tiré du tube n°3 où il n'y a pas eu de croissance bactérienne visible de la souche *Bacillus cereus* ATCC 10876.

D'après la figure 25 on remarque un développement partiel de *Bacillus cereus* ATCC 10876 sur la boîte de pétri, on déduit alors que l'huile essentielle *Mentha x piperita* L. exerce un effet bactériostatique sur cette souche.

L'activité de l'HE de menthe poivrée sur la souche *Escherichia coli* :

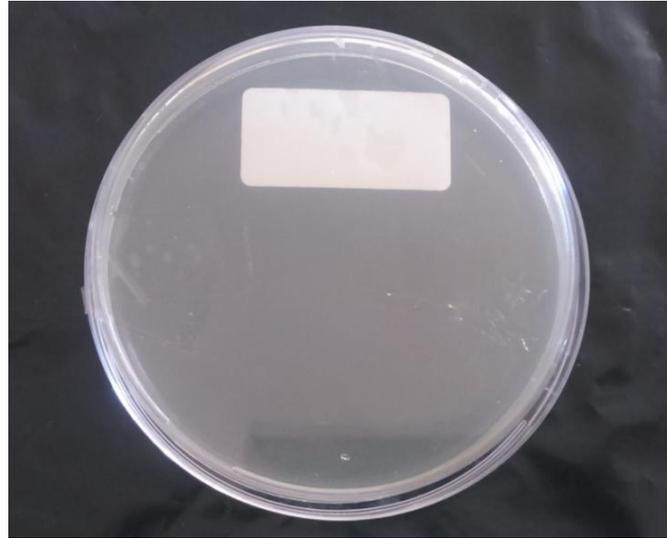


Figure 26 : Résultat d'ensemencement (CMB) d'un échantillon tiré du tube n°6 où il n'y a pas eu de croissance bactérienne visible de la souche *Escherichia coli*.

Selon la figure 26 on remarque l'absence totale du développement d'*Escherichia coli* sur la boîte de pétri, à partir de cela on peut dire que l'HE de *Mentha x piperita* L. à la concentration de 1,98 $\mu\text{l/ml}$ présente une activité bactéricide contre cette souche.

D'après HAMMER *et al.* (1999), les résultats du test sur la CMI effectuée sur plusieurs microorganismes démontrent que la menthe poivrée présente une CMI équivalente à 0,12 $\mu\text{l/ml}$ pour *Escherichia coli*, et de 0,12 % V/V pour *Staphylococcus aureus*.

SATMI et HOSSAIN (2016), ont rapportés que l'huile essentielle de la menthe poivrée avait une activité antimicrobienne modérée sur *Staphylococcus aureus* ainsi que sur *Escherichia coli* lors d'utilisation d'une concentration de 2.5 mg/ml.

En 2006, SCHELZ et ces collaborateurs ont démontrés que *Mentha x piperita* L. avait une grande activité antimicrobienne contre *Escherichia coli* F'lac K12 LE140 avec une CMI qui est de 0,4mg/ml.

Selon IDIR (2010), qui a testé l'activité antibactérienne de 3 huiles essentielles dont la menthe poivrée vis-à-vis d'*E.coli*, *Shigella Flexrin*, *Slmonella paratyphi*, *S. aureus* et *B.cereus*. Il a constaté que l'HE de la menthe poivrée présente des CMI allant de 16,94 à 111 µg/ml.

DJENANE *et al.* (2012), ont pu montrer une sensibilité d'*Escherichia coli* et de *Staphylococcus aureus* à l'HE de la menthe poivrée avec une CMI de 0,50 µl/ml.

5.2 Résultats des CMB de *Cupressus sempervirens* L.

La nature de l'activité antibactérienne de *Cupressus sempervirens* L. sur *Staphylococcus aureus* est révélée par un repiquage à partir des tubes de la CMI, sur des boites de Pétri.

Le résultat est montré dans la figure suivante :

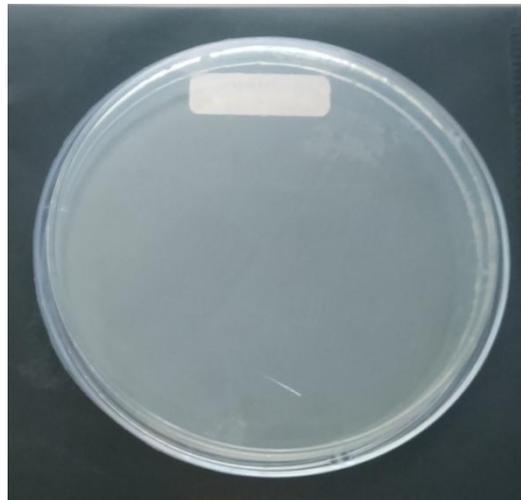


Figure 27 : Résultat d'ensemencement d'un échantillon tiré du tube de la solution mère où il n'y a pas eu de croissance bactérienne visible de la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

La figure 27 ne montre aucune croissance bactérienne sur la boite de pétri, la concentration en HE de cyprès utilisée qui est de 126,76 µl/ml est bactéricide pour cette

souche. On constate alors que pour avoir un effet bactéricide sur cette souche la concentration de l'HE du cyprès doit être assez élevé.

Cela dit selon HAMMER *et al.* (1999), l'HE du cyprès à une activité bactéricide excellente contre *S.aureus* avec une CMI de 2% V/V.

Selon les travaux de CHANEGRIHA *et al.* (1998), les souches microbiennes *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* testées avec l'HE du cyprès présentent des CMI respectives de 53mg/ml et de 17mg/ml.

Les différences existantes entre ces résultats et les nôtre peuvent être due à la différence entre les souches utilisées ou à la différence entre la composition chimique des HEs.

6. Résultats de la combinaison des deux huiles essentielles

6.1. Résultats des témoins négatifs réalisés avec le DMSO

La figure suivante représente les deux témoins négatifs de cette étude, il s'agit du témoin négatif de *Staphylococcus aureus* d'origine clinique et *Bacillus cereus* ATCC 10876 (avec le DMSO).

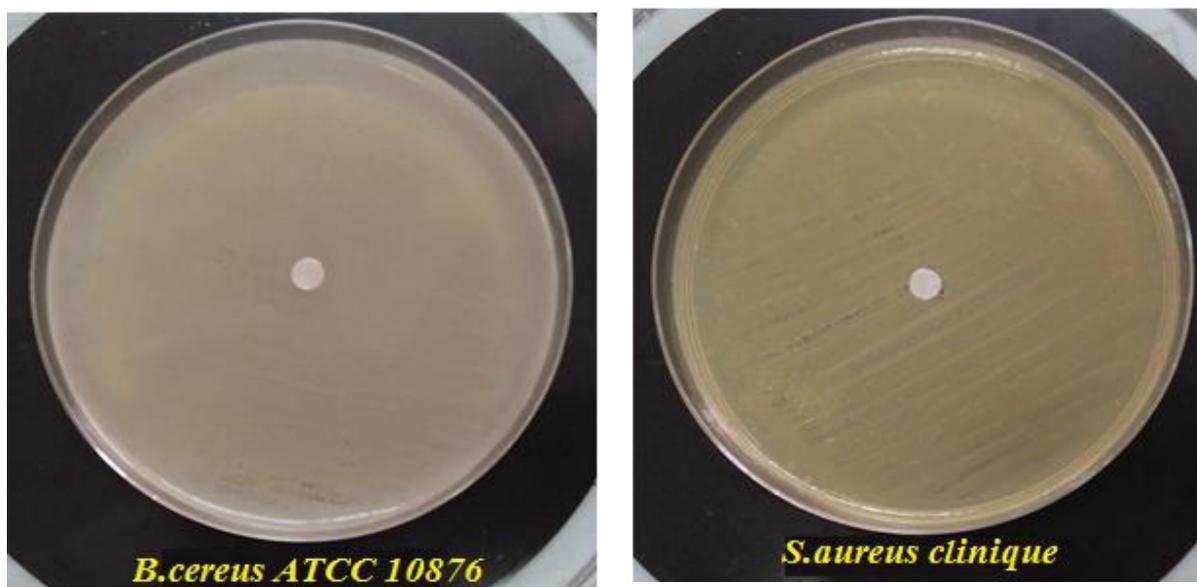


Figure 28 : photos des deux témoins négatifs (*Bacillus cereus* ATCC 10876 et *S.aureus* d'origine clinique) réalisés avec le DMSO.

6.2.Résultats de la combinaison de l’H.E de *Mentha x piperita* L. (50%) et *Cupressus sempervirens* L. (50%)

Cette combinaison est réalisée à fin de déduire s’il ya un effet de synergie lors de la combinaison entre l’HE de menthe poivrée et celle du cyprès vert, ou au contraire il y aurait un antagonisme entre les deux huiles essentielles. La figure suivante montre les résultats de ce test.

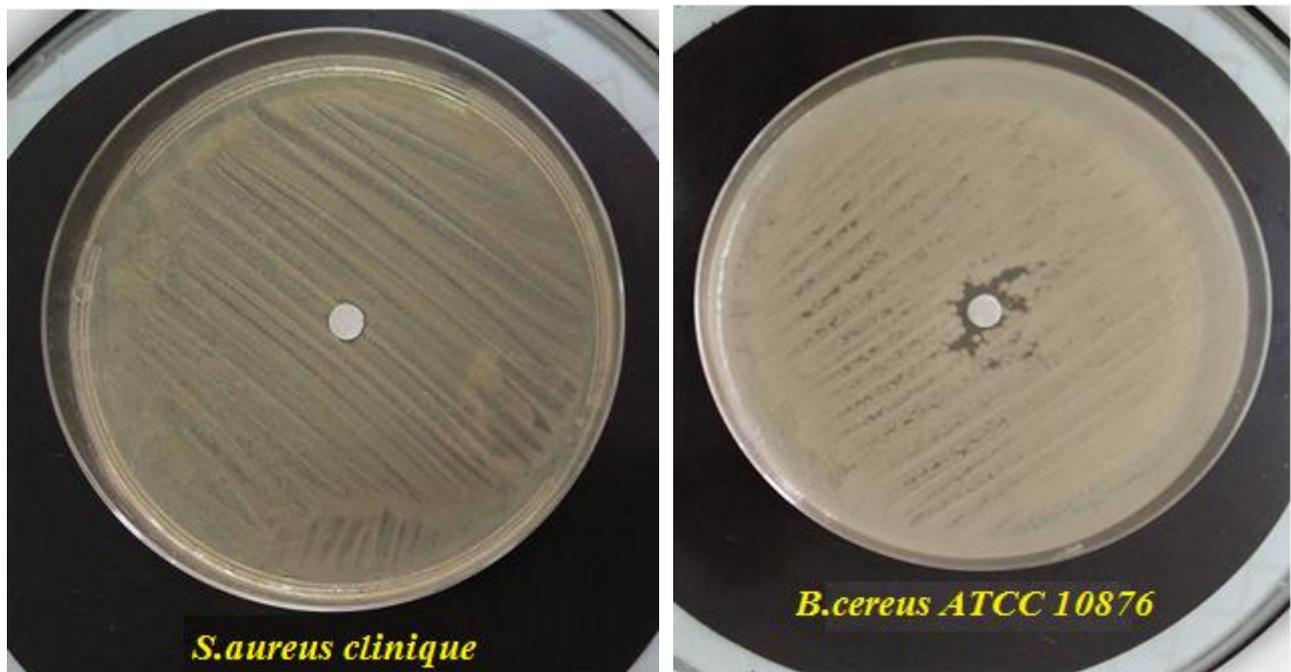


Figure 29 : Photographies du test de sensibilité de *Staphylococcus aureus* et de *Bacillus cereus* ATCC 10876 d’origine clinique vis-à-vis de la combinaison de 50% de l’HE de la menthe poivrée et 50% de l’HE du cyprès vert.

6.3.Résultats de la combinaison de l’H.E de *Mentha x piperita* L. (75%) et *Cupressus sempervirens* L. (50%)

Vu que l’HE de menthe poivrée a donné de meilleurs résultats que celle du cyprès, donc pour la deuxième combinaison entre les HEs une proportion plus grande en HE de menthe poivrée (75%) a été choisi. La figure suivante illustre les résultats obtenus suite à cette combinaison sur les deux souches bactériennes testées précédemment.

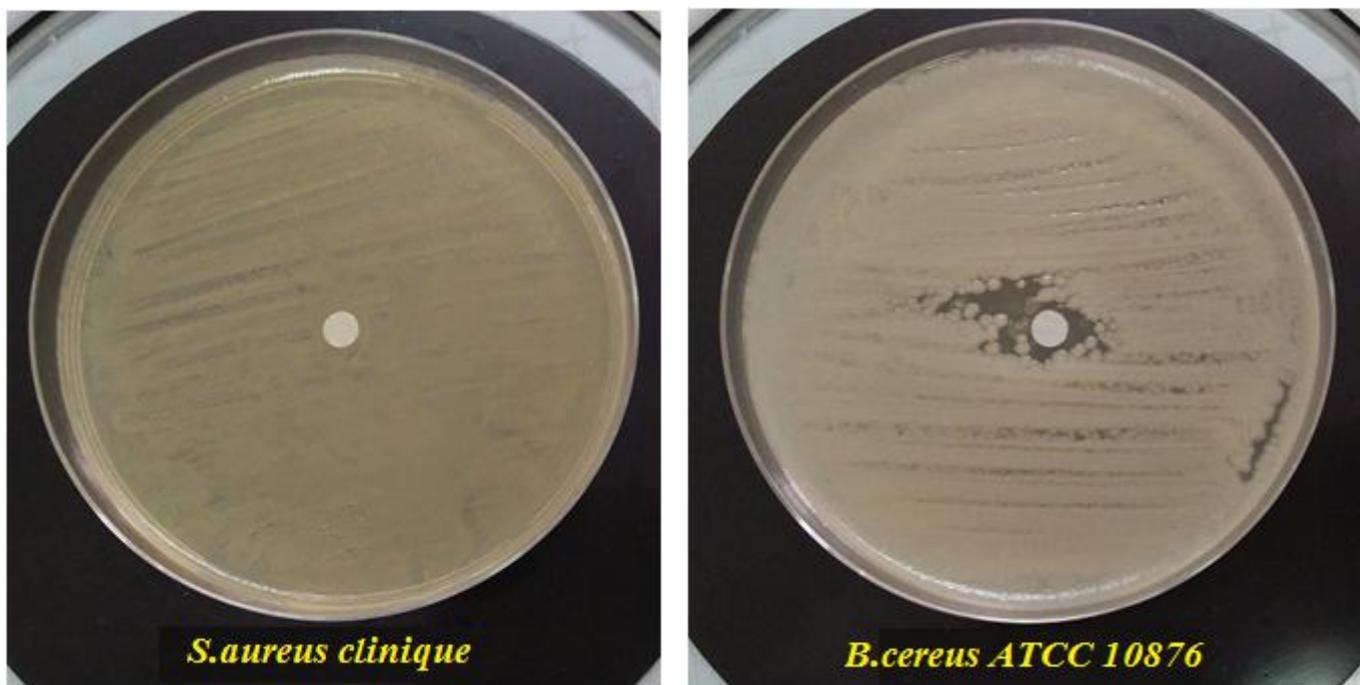


Figure 30 : Photographies du test de sensibilité de *Staphylococcus aureus* et de *Bacillus cereus* ATCC 10876 d'origine clinique vis-à-vis de la combinaison de 75% de l'HE de la menthe poivrée et 25% de l'HE du cyprès vert.

D'après les deux figures précédentes (29 et 30), on remarque que la combinaison entre les deux HEs quelle que soit la proportion (50%-50%) ou (75% - 25%) n'a aucun effet antibactérien contre *S.aureus* d'origine clinique alors que les deux HEs testées seules ont un pouvoir antibactérien important contre cette souche.

En ce qui concerne *Bacillus cereus* ATCC 10876, la combinaison des deux huiles essentielles possède un effet antimicrobien contre cette souche, qui grandit avec une plus grande proportion en HE de menthe poivrée car avec la combinaison 50% d'HE de menthe poivrée et 50% d'HE du cyprès la zone est de 8mm environ (pas bien définit) alors qu'avec la proportion 75% d'HE de menthe poivrée et 25% d'HE du cyprès cette zone grandit un peu atteignant 10mm mais cela dit cette activité est faible tandis que celle obtenue avec l'HE de menthe poivrée seule est deux fois plus important.

On déduit donc que la combinaison entre l'HE de menthe poivrée et celle du cyprès n'a pas présenté de synergie contre les deux souches bactériennes testées mais au contraire un antagonisme.

Il existe plusieurs hypothèses pour expliquer l'effet antagoniste. D'après HALCON et MILKUS (2004), les dilutions appliquées n'ont aucun effet sur la cible. Par contre HAMMER *et al.* (2006), suggèrent qu'il y a une toxicité de l'huile essentielle qui dépend de la dose et de la durée de l'exposition. Mais il doit y avoir d'autres mécanismes vu que dans notre cas les concentrations utilisées sont les mêmes, et qui pourrait être due aux interactions chimiques entre les composants des deux HEs où certains composants peuvent en inhiber d'autres qui seraient responsables de l'activité antibactérienne.

Cela dit des effets synergiques ont été observés lors de diverses études, par exemple selon l'étude d'OUEDRHIRI *et al.* (2017), un effet synergique total et partiel sur l'activité antibactérienne a été observé lors de la combinaison entre l'huile essentielle du géranium d'Egypte (*Pelargonium asperum*) et celle de la camomille sauvage (*Ormenis mixta*), cet effet synergique entre ces deux huiles essentielles pourrait s'expliquer par la capacité des hydrocarbures (monoterpènes et sesquiterpènes), qui sont les principaux composés de l'HE d'*O. mixta* d'intégrer et perturber la membrane cellulaire, et donc, Ils facilitent l'absorption des terpénoïdes actifs (citronellol, Geraniol, citronellyl ester et isomenthone).

Ces auteurs ont signalé qu'il y a des mécanismes d'interactions antibactériennes qui produisent cette synergie : l'inhibition séquentielle d'un produit commun d'une voie biochimique, inhibition des enzymes protectrices, combinaisons des agents actifs de la paroi cellulaire et l'utilisation agents actifs de la paroi cellulaire pour améliorer l'absorption d'autres antimicrobiens.

Selon CHEBAIBI *et al.* (2015), qui ont évalué le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de sept plantes médicinales récoltées au Maroc, ont conclu que les huiles essentielles testées sur *P.aeruginosa* sont inefficaces, mais l'association des huiles, présente un effet synergique important contre *P.aeruginosa* avec une activité bactéricide intéressante.

Il y a plusieurs études qui décrivent des mécanismes de synergie ou d'addition de l'activité antibactérienne résultante de la combinaison entre les HEs ou certains de leurs constituant avec les antibiotiques, car les HEs peuvent potentialiser l'activité des antibiotiques. (KON et RAI, 2012 ; LANGEVELD *et al.*, 2013). D'autres ont évalué cette activité avec une combinaison entre les HEs et le vinaigre, qui a exercé une activité antibactérienne importante. Il a été montré que cette activité est principalement due au vinaigre. (GUL *et al.*, 2012)

7. Activité antifongique des deux huiles essentielles

7.1. Confirmation de la pureté de la souche fongique « *Aspergillus niger* », étude macroscopique et microscopique

Tableau XIII : Caractères macroscopiques et microscopiques d'*Aspergillus niger*.

<i>Aspergillus niger</i>	
Caractères macroscopiques	Caractères microscopiques
<ul style="list-style-type: none"> - Mycélium aérien d'abord blanc, puis jaune et enfin granuleux noir ; - Revers des colonies : incolores à jaune pâle pour les colonies jeunes, brun pour les colonies adultes ; - Aspect des colonies et leur consistance : poudreuses, duveteuses a granuleuse. 	<p>Thalle à mycélium cloisonné portant des têtes aspergillaires (spécificité du genre aspergillus) qui sont des vésicules à l'extrémité des conidiophores qui donne naissance à des spores externes allongées (stigmates ou phialides) qui à leur tour donnent des conidies.</p>

7.2. Résultats des témoins réalisés par la méthode de diffusion sur gélose

7.2.1. Résultats des témoins négatifs réalisés avec le DMSO

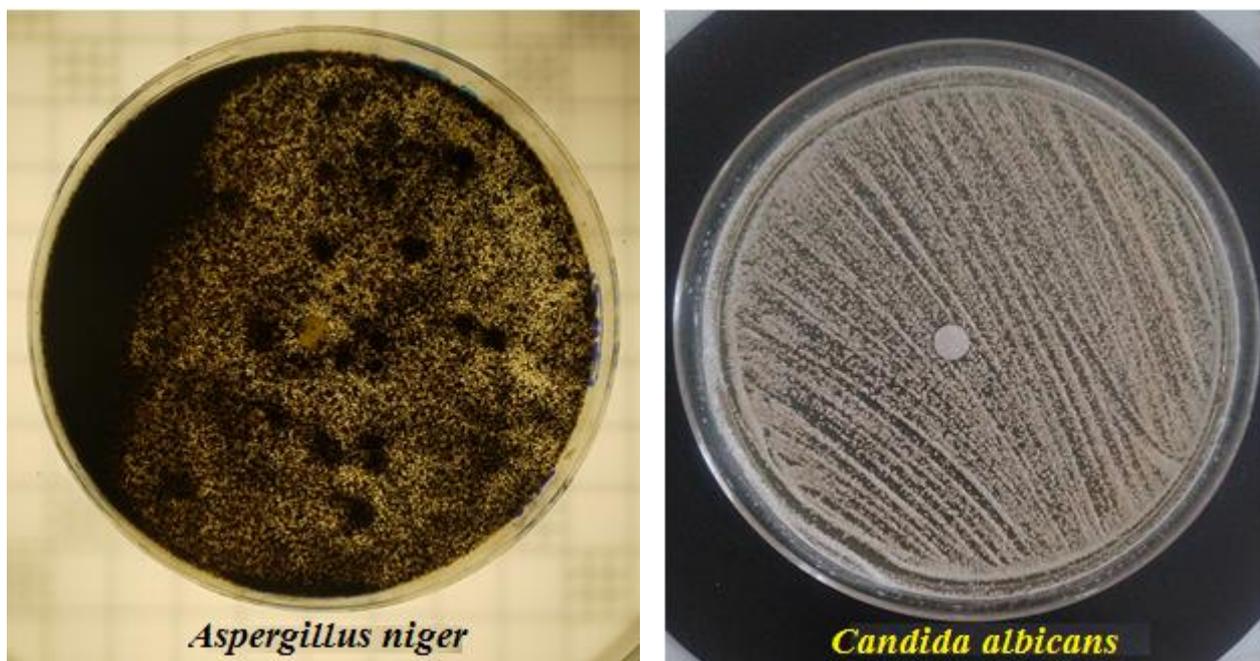


Figure 31 : photographies des témoins négatifs des souches fongiques testées pour l'activité antifongique des deux HEs issues de : *Mentha x piperita* L et *Cupressus sempervirens* L.

A partir de cette figure on constate que le DMSO n'a aucun effet sur les deux souches fongiques donc ce dernier est inerte vis-à-vis de l'activité antifongique.

7.2.2. Résultats des témoins positifs réalisés avec l'antifongique

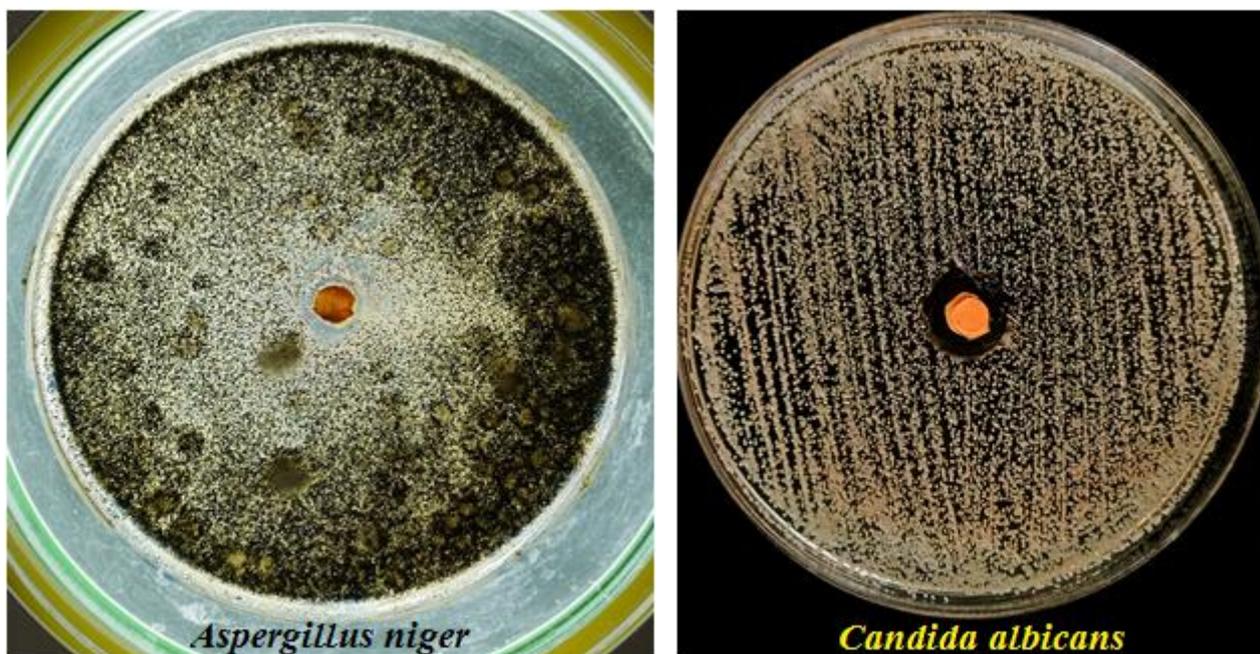


Figure 32 : photographies des témoins positifs des souches fongiques testées pour l'activité antifongique des deux HEs issues de : *Mentha x piperita* L. et *Cupressus sempervirens* L.

Le tableau suivant illustre les diamètres d'inhibition de l'antifongique utilisé pour les témoins positifs

Tableau XIV : tableau illustrant le diamètre d'inhibition de l'antifongique utilisé contre les deux souches fongiques

Souches fongiques	Amphotéricine B Fungizone®
<i>Aspergillus niger</i>	10 mm
<i>Candida albicans</i>	12 mm

A partir de ce tableau on remarque que l'activité qu'exerce l'Amphotéricine B contre les deux souches fongiques est faible car les deux diamètres ne sont que de 10 et 12mm.

7.3.Sensibilité des deux souches fongiques vis-à-vis des deux huiles essentielles

La méthode suivit pour l'évaluation de cette activité est la même que celle suivit lors de l'évaluation de l'activité antibactérienne il s'agit de la méthode de diffusion des disques sur gélose sauf qu'ici le milieu de culture utilisé est le sabouraud (leur milieu favorable).

7.3.1. Sensibilité des deux souches fongiques vis-à-vis de l'HE de *Mentha x piperita* L.

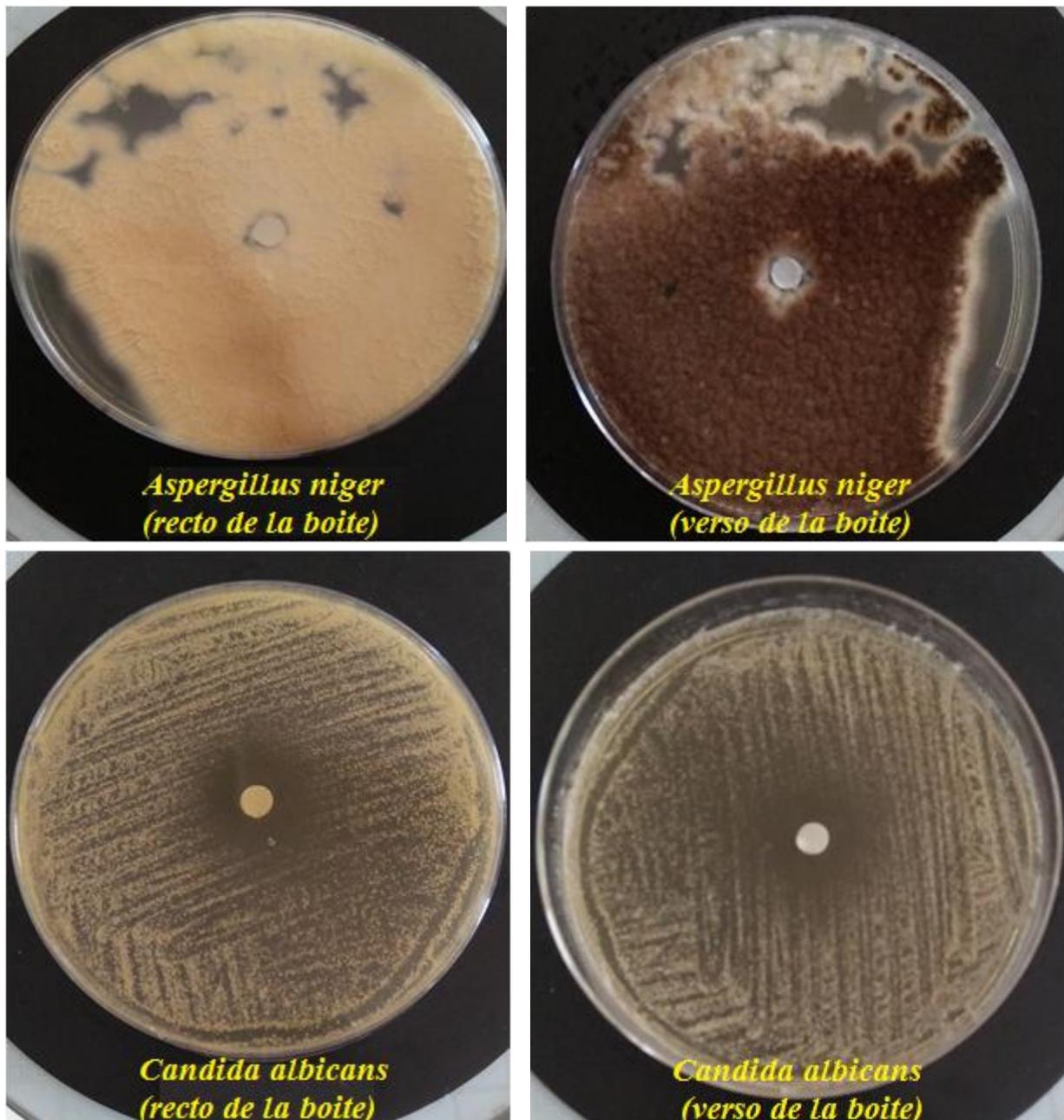


Figure 33 : photographies des tests de sensibilités (recto-verso) des souches fongiques vis-à-vis de l'huile essentielle de *Mentha x piperita* L.

Le diamètre des zones d'inhibition (le diamètre des disques qui est de 6mm est inclus dans la mesure) ainsi que la sensibilité des souches fongiques vis-à-vis de l'huile essentielle de la menthe poivrée sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau XV : Résultats des diamètres d'inhibition en mm (moyenne \pm l'écart type) de l'activité antifongique de l'H.E de *Mentha x piperita* L.

<i>Mentha x piperita</i> L.			
Souches fongiques		Diamètres d'inhibition (mm) en moyenne des deux essais \pm l'écart type	sensibilité
champignon	<i>Aspergillus niger</i>	7,5 \pm 0,70	-
levure	<i>Candida albicans</i>	25,5 \pm 6,36	+++

A partir des résultats de ce tableau, on constate que l'HE de la menthe poivrée possède une activité très importante vis-à-vis de *Candida albicans* par contre elle a une faible activité contre *Aspergillus niger*.

7.3.2. Sensibilité des deux souches fongiques vis-à-vis de l'HE *Cupressus sempervirens* L.

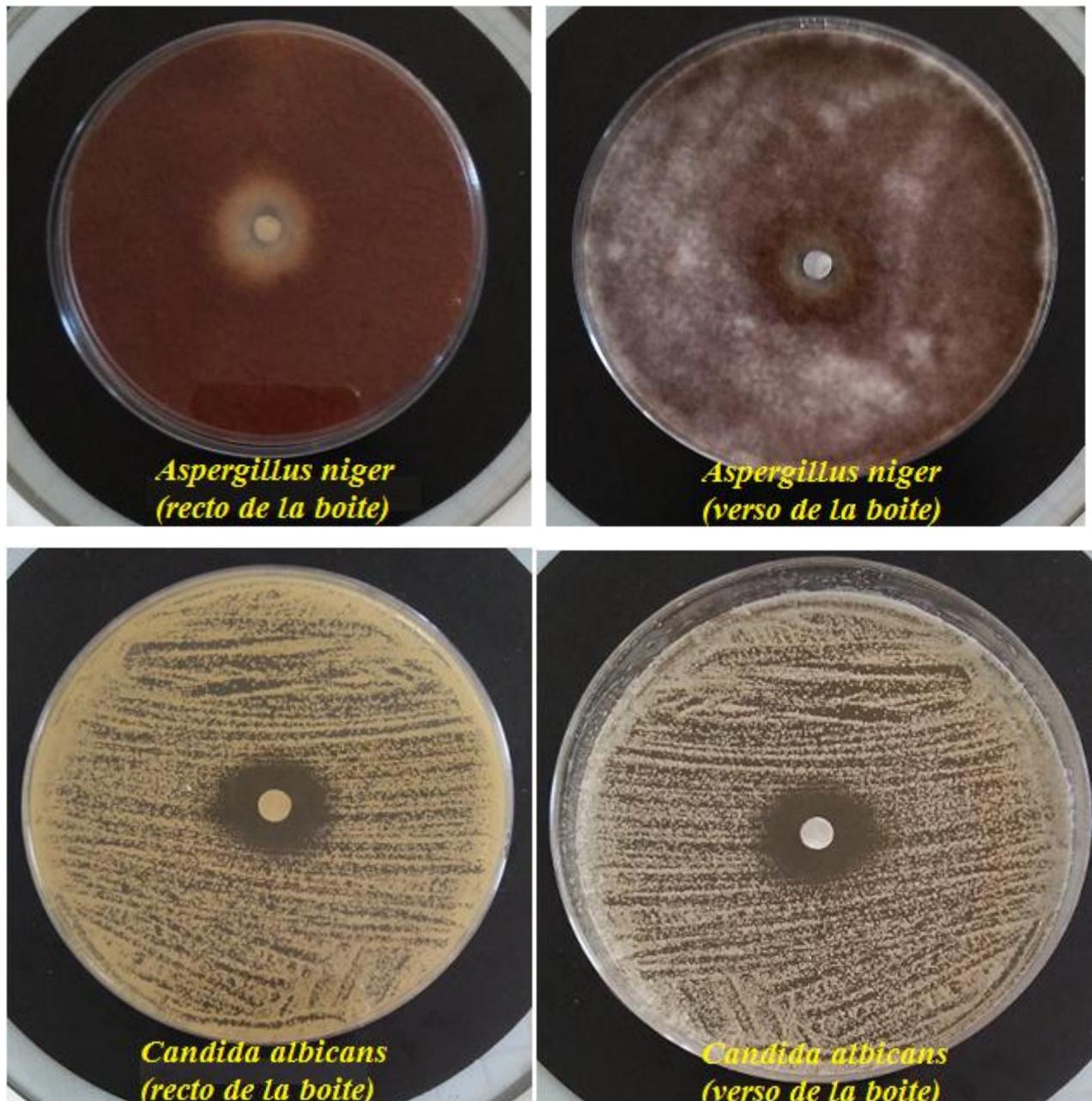


Figure 34 : photographies des tests de sensibilités (recto-verso) des souches fongiques vis-à-vis de l'huile essentielle de *Cupressus sempervirens* L.

Le diamètre des zones d'inhibition (le diamètre des disques qui est de 6mm est inclus dans la mesure) ainsi que la sensibilité des souches fongiques vis-à-vis de l'huile essentielle du cyprès vert sont résumés dans le tableau suivant

Tableau XVI : Résultats des diamètres d'inhibition en mm (moyenne \pm l'écart type) de l'activité antifongique de l'H.E de *Cupressus sempervirens* L.

<i>Cupressus sempervirens</i> L.			
Souches fongiques		Diamètres d'inhibition (mm) en moyenne des deux essais \pm l'écart type	sensibilité
champignon	<i>Aspergillus niger</i>	21 \pm 1,41	+++
levure	<i>Candida albicans</i>	17,5 \pm 4,95	+++

A partir des résultats de ce tableau, on remarque que l'HE du cyprès vert possède une activité très importante vis-à-vis des deux souches fongiques, surtout contre *Aspergillus niger*.

Les résultats de l'activité antifongique des deux huiles essentielles ainsi que celle qu'exerce l'antifongique utilisé sont résumés dans l'histogramme de la figure suivante :

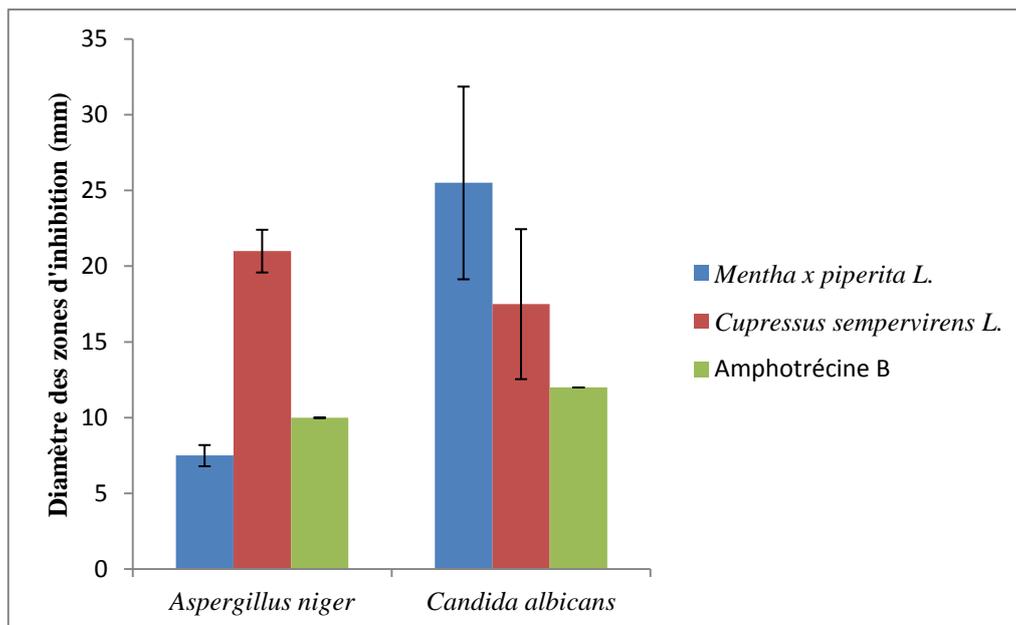


Figure 35 : Représentation graphique des tests de sensibilité des souches fongiques vis-à-vis des deux huiles essentielles testés; l'HE de *Mentha x piperita L.* et celle de *Cupressus sempervirens L.* ainsi que l'antifongique utilisé.

D'après l'histogramme de la figure 35 on constate que l'HE de *Mentha x piperita L.* possède une importante activité antifongique contre *Candida albicans* avec un diamètre d'inhibition qui est de 25,5mm, ce diamètre est beaucoup plus important que celui obtenu avec l'Amphotéricine B qui n'est que de 12mm. Par contre cette HE possède un faible pouvoir antifongique (voire même nul) contre *Aspergillus niger* car le diamètre d'inhibition est de 7,5mm, qui est inférieur au diamètre obtenue avec l'antifongique.

Quant à l'HE de *Cupressus sempervirens L.*, elle possède un pouvoir antifongique important contre les deux souches. En effet *Candida albicans* est très sensible à cette HE avec un diamètre d'inhibition supérieur à celui obtenu avec l'antifongique (12mm) et qui est de 17,5mm, *Aspergillus niger* est aussi très sensible à l'HE du cyprès avec un diamètre d'inhibition de 21mm qui est également supérieur à celui de l'antifongique (10mm).

De façon générale les deux huiles essentielles possèdent un pouvoir antifongique très important (sauf pour l'HE de la menthe poivrée qui n'avait pas d'effet sur *A.niger*) même

plus important que celui obtenu avec l'antifongique utilisé. Ainsi, les différences observées entre les activités antifongiques des deux HEs étudiées peuvent être attribuées à des différences dans leurs composants actives, donc il convient de noter qu'il existe une sensibilité différentielle des souches testées vis-à-vis des deux HEs étudiées.

D'après l'analyse de la variance (annexe II) les résultats sont hautement significatifs vu que ($p\text{-value} < 0,05$) et ce en tenant compte de l'influence des deux paramètres à la fois à savoir les huiles essentielles et les souches fongiques, on déduit donc que l'activité antifongique qu'exerce les des deux HEs vis-à-vis des mêmes souches est différente, ainsi le test de Newman Keuls (annexe II) les a classé en deux groupes homogène (moins sensible et extrêmement sensible). Par contre si les paramètres sont pris à part c.-à-d. les souches fongiques à part et les huiles essentielles à part on constate que $p\text{-value} > 0,05$ donc il n'y a pas de différence entre l'action des deux huiles essentielles sur les mêmes souches fongiques.

Selon les travaux effectués par HAMMER *et al.*(1999), l'HE essentielle de la menthe poivrée possède un important pouvoir antifongique contre *Candida albicans* avec une CMI qui est de $0,5\mu\text{l/ml}$, l'HE du cyprès exerce elle aussi un important pouvoir antifongique contre cette souche mais moins important que celui de la menthe poivrée (CMI supérieure à $2\mu\text{l/ml}$). Ces résultats concordent avec les nôtre.

D'après SCHELZ *et al.* (2006), les résultats des tests de l'activité antifongiques de l'HE de la menthe poivrée démontrent qu'elle possède un moyen pouvoir antifongique contre *Saccharomyces cerevisiae* 0425 52C avec un diamètre d'inhibition de 12mm et une bonne activité contre *Saccharomyces cerevisiae* 0425 $\delta/1$ avec un diamètre d'inhibition qui est de 15mm. Donc à partir de cette étude et de la nôtre on peut conclure que l'HE de la menthe poivrée possède une bonne activité contre les levures.

L'étude réalisée par MAZARI *et al.* (2010), sur l'activité antimicrobienne de deux HEs dont celle du cyprès isolée d'Algérie démontre que l'HE du cyprès possède un pouvoir antifongique modéré contre *Aspergillus flavus* et *Fusarium oxysporum*. Cependant, Les deux huiles n'étaient significativement pas actives contre *Rhizopus Stolonifer* et les effets inhibiteurs des huiles sur la croissance des souches fongiques étaient plus faibles par rapport à

l'amphotéricine B, comparant aux résultats de notre étude on déduit des différences significatives vue que dans notre cas l'HE du cyprès a présenté un pouvoir antifongique très important contre *Aspergillus niger*. Ces différences peuvent être dues au fait que les souches utilisées sont différentes ainsi qu'à l'hétérogénéité qui pourrait exister entre la composition chimique des deux HEs.

L'étude réalisée par SELIM *et al.*(2014), a démontré que l'huile essentielle du cyprès vert ne présente aucune activité contre les deux levures testées, qui sont : *Candida albicans* et *saccharomyces cerevisiae*. Ce qui ne concorde pas avec nos résultats vue qu'on a obtenu une très bonne activité contre *Candida albicans*.

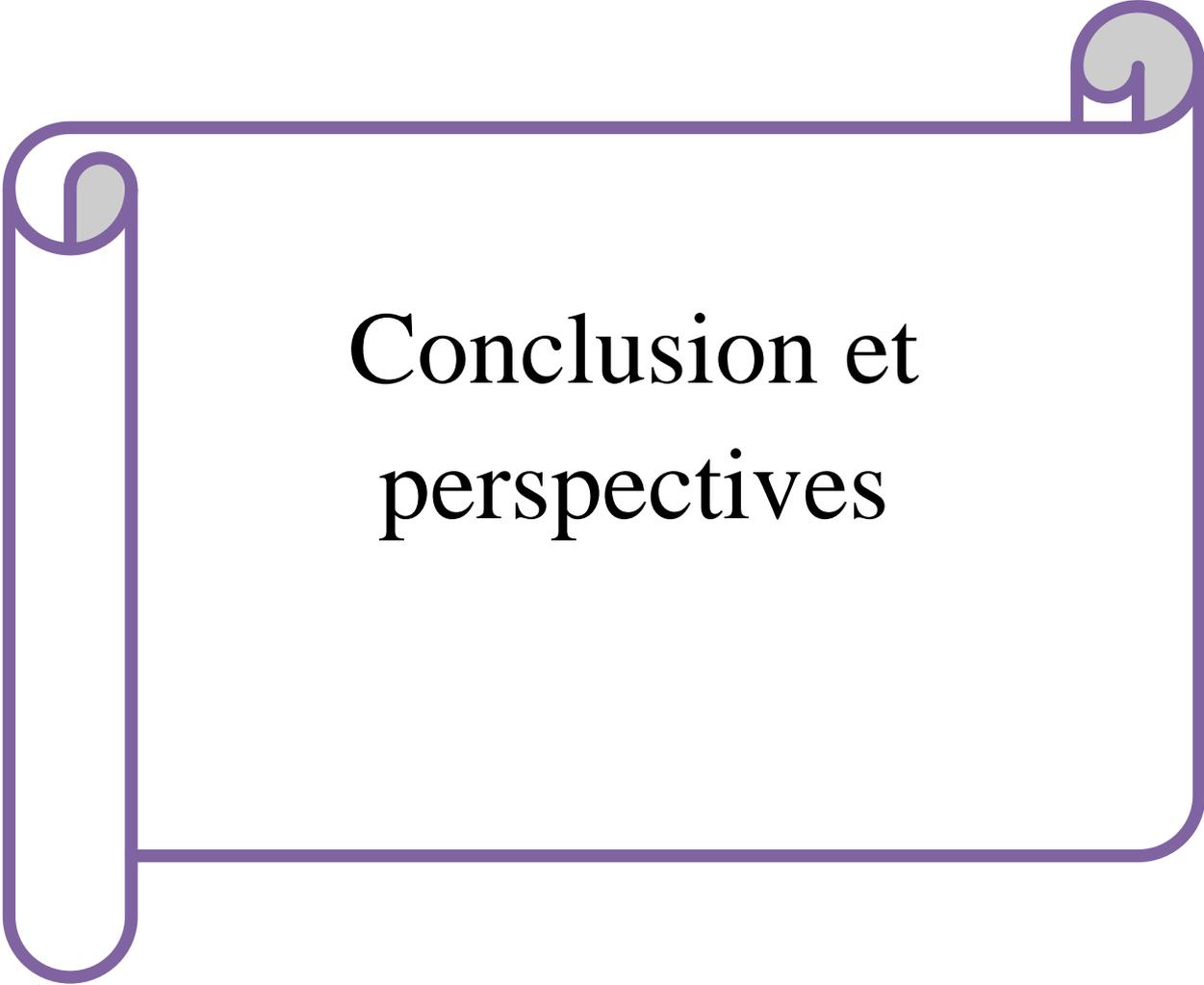
Selon l'étude réalisée par ISMAILI *et al.* (2014), l'évaluation de l'activité antifongique des HEs de trois plantes aromatiques marocaine a montré une variation d'inhibition qui est en fonction de nombreux facteurs, notamment la nature et la concentration de l'huile essentielle, ainsi que la souche fongique étudiée.

En générale, la variabilité des résultats qui peut exister entre les différentes études de l'activité antifongique est probablement due à l'influence de plusieurs facteurs tels que la méthodologie, les microorganismes testés et les huiles essentielles utilisées (PATRNAIK *et al.*, 1996). Car d'après SUHAR et NIELSEN (2003), l'effet antifongique des huiles dépend de la méthode d'application, car les grands composés phénoliques tels que le thymol et l'eugénol (thym et clou de girofle) appliqués directement au milieu ont eu un meilleur effet, tandis que les plus petits composés tels que allyl isothiocyanate et citral (mustard et lemongrass) étaient les plus efficaces par évaporation.

Plusieurs études ont montré que la pulégone et le 1,8-cinéole purs provoquent une inhibition de la croissance mycélienne, mais à des concentrations plus élevées que les huiles essentielles dans leur totalité. Ainsi l'activité de l'huile essentielle est le résultat de ses composés majoritaires, mais aussi de l'effet synergique des composés minoritaires (CHEBLI *et al.*, 2003 ; OURAINI *et al.*, 2007 ; VILELA *et al.*, 2009).

D'après ces études et la nôtre on peut conclure que l'évaluation de l'activité antifongique *in vitro* peut se faire de différentes manières (contact direct et indirecte, diffusion

des disques sur géloses...), de ce fait la méthodologie de travail peut influencer les résultats de cette activité, ainsi que bien d'autres facteurs comme la variabilité de la composition chimique des HEs. Ces derniers peuvent être de très bon agent antifongiques naturelles et parfois meilleur que les antifongiques commercialisés pour lesquels certaines souches présentent des résistances, mais afin de les utilisés pour la préservation de la nourriture ou à des fins médicales, les problèmes de sécurité et de toxicité devront être abordés.



Conclusion et
perspectives

Vu l'émergence de la résistance microbienne aux antibiotiques des alternatives doivent être mises en place pour remédier à ce problème, du fait des activités biologiques importantes des huiles essentielles, ces dernières constituent un très bon moyen de lutte contre cette résistance.

Dans ce contexte notre travail a été réalisé à fin de tester le pouvoir antimicrobien de deux huiles essentielles, celle extraite à partir de la menthe poivrée (*Mentha x piperita L.*) et celle extraite à partir du cyprès (*Cupressus sempervirens L.*)

Les résultats obtenus montrent que l'activité antimicrobienne des deux huiles essentielles varie selon la souche bactérienne ou fongique testée, mais aussi selon l'HE elle-même, comme on peut le constater, des souches pouvaient montrer une sensibilité assez importante pour l'HE de la menthe poivrée et une sensibilité moindre pour le cyprès et vice versa.

En effet, l'huile essentielle de la menthe poivrée présente une très importante activité antimicrobienne contre la souche *Bacillus cereus ATCC 10876* ainsi que *Staphylococcus aureus*, pour ce qui est de la souche *Staphylococcus aureus ATCC 25923*, cette dernière est très sensible à l'HE du Cyprès mais juste sensible à l'HE de la menthe poivrée, pour ce qui est d'*Escherichia coli ATCC 25922* et de *Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853* les deux huiles essentielles ont presque la même activité sur ces deux souches (une activité faible pour la première, et inexistante en ce qui concerne la seconde).

L'huile essentielle de la menthe poivrée a aussi une forte activité antifongique pour *Candida albicans*, celle du cyprès montre une plus grande activité pour *Aspergillus Niger*.

De ce fait, on peut constater que nos deux huiles essentielles ont des activités assez importantes contre plusieurs souches bactériennes pouvant causer des maladies graves, leur effet antimicrobien est comparable à celui des antibiotiques synthétiques utilisés actuellement

pour lutter contre les maladies que peuvent causer ces microorganismes, donc ces HEs peuvent remplacer les antibiotiques actuels en vue d'une meilleure activité et pour lutter contre l'antibiorésistance.

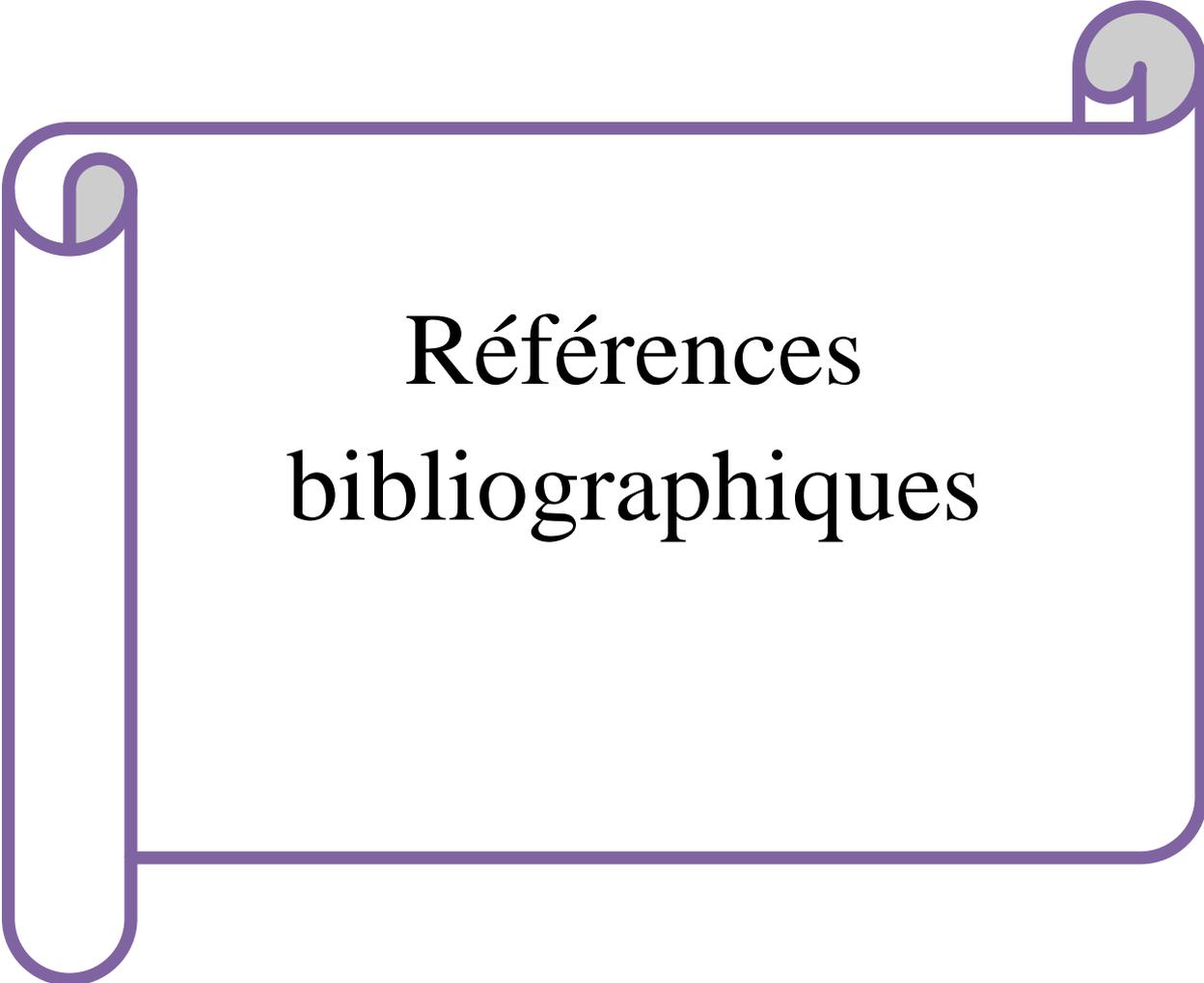
Ces HEs peuvent aussi être utilisés comme conservateurs pour les aliments, ou dans les cosmétiques, et cela en respectant des concentrations bien précises, les résultats des CMI réalisées lors de ce travail montrent qu'à des concentrations basses, nos deux huiles essentielles avaient une activité antimicrobienne importante, surtout en ce qui concerne la menthe poivrée avec *Escherichia coli*.

Les huiles essentielles peuvent constituer l'avenir de la lutte antimicrobienne, de par leur facilité d'extraction, l'abondance des plantes dont elles sont extraites dans la nature, le fait qu'elles soient naturelles et donc meilleurs pour la santé.

En plus de leurs activité antimicrobienne, ces huiles essentielles peuvent être utilisés dans plusieurs domaine comme la parfumerie, la cosmétologie, l'aromathérapie, l'aromatique, mais aussi comme calmants.

A partir des résultats satisfaisants obtenus lors de notre étude *in vitro* qui ne constituent qu'une étape préliminaire pour l'étude de l'activité antimicrobienne des HEs, ces dernières peuvent être des candidats de choix pour des études plus approfondies afin d'envisager des utilisations plus large de ces derniers, parmi ces études on peut citer :

- Effectuer des études *in vivo* sur l'activité antifongique surtout pour l'HE de *Cupressus sempervirens* L. sur *Aspergillus niger* pour envisager son éventuelle utilisation en tant que conservateur;
- Evaluer la toxicité des deux huiles essentielle pour une éventuelle utilisation dans le domaine médical et industriel ;
- Analyser la composition chimique des deux huiles essentielles par la technique CG/MS à fin d'isoler le principe actif responsable de l'activité antimicrobienne.



Références
bibliographiques

- Aires J. (2011).** Les systèmes d'efflux actifs bactériens : caractérisation et modélisation pour quelles perspectives ?. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire.*, 3(164): 265-270.
- Areslan M., Dervis S. (2010).** Antifungal activity of essential oils against three vegetative-compatibility groups of *Verticillium dahlia*. *World Journal Microbial Biotechnology.*, 26: 1813-1821.
- Avlessi f., Dango J., Wotto V.D., Alitonou G.A., Sohounhloue D.K. et Menut C. (2004).** Propriétés antioxydante de l'huile essentielle des feuilles de *Clausena anisata* (Wild) Hook. *Compte Rendue Chimie.*, 7: 1057-1061.
- Baba Ahmed-Kazi Tani Z., Arlet G. (2014).** Actualité de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif en Algérie. *Pathologie Biologie.*, 3(62): 133-139.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D. et Idaomar M. (2008).** Biological effects of essential oils - a review. *Food Chemistry Toxicology.*, 46: 446-475.
- Balakrishnan A. (2015).** Therapeutic uses of peppermint a review. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research.*, 7(7): 474-476.
- Bassoulé I.H.N., Juliani H.R. (2012).** Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules Review.*, 17:3989-4006.
- Barbosa L.C.A., Cleber J.S., Demuner A.J., Montanari R.M., Pinheiro A.L., Dias I. et Andrade N.J. (2010).** Chemical composition and antibacterial activities from the essential oils of myrtaceae species planted in Brazil. *Química Nova.*, 1(33): 104-108.
- Bechaalany P. (2005).** Ostéopathie et aromathérapie l'utilisation des huiles essentielles dans les affections inflammatoire en complément du traitement ostéopathique. Mémoire, L'european school of animal osteopathy, Angleterre.
- Belaiche P. (1979).** Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. Tome 1 : l'aromatogramme .éd. Maloine. Paris.
- Belhadj Salah-Fatnassi. K., Slim-Bannour A., Aouni M., Harzallah-Skhiri .F., Mahdjoub M.A., Mighri Z. et Chaumont J.P. (2010).** Activité antivirale et antioxydante *in vitro* d'huiles essentielles de *Thymus capitatus* (L.) Hoffmans & link de Tunisie. *Acta Botanica Gallica.*, 157(3) : 433-444.

Benayad N. (2008). Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines : moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées. Mémoire, Université Mohammed V – Agdal. Rabat, Maroc.

Bencheqroun H.K., Chanmi M., Satrani B., Afi A. et Chaouch A. (2012). Activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Artemisia mesatlantica*, plante endémique du Maroc. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège.*, 18: 4-21.

Bignell CM., Dunlop P.J., Brophy J.J. et Jackson J.F. (1996). Volatile leaf oils of some south-western and southern Australian species of the genus *Eucalyptus* Part VII Subgenus *Symphomyrtus*, section *Exsertaria*. *Flavour Fragrance Journal.*, 11 : 35-41.

Bissangou M.F., Ouamba J.M. (1997). Valorisation chimique de quelques espèces aromatiques et médicinales du Congo (*Ageratum conyzoides* L, *Chromolaena odorata* King et Robinson, *Hyptis suaveolens* Poit et *Lippia multiflora* Moldenke). *Pharmacologie Médicale Traditionnelle Africaine.*, 9: 70-84.

Boukssaim H., Ghanmi M., Satrani B., Aafi A., Aberchane M., Khia A., Alaoui M.S.B., Chaouch A. et Farah A. (2013). Caractérisation chimique et microbiologique des huiles essentielles des rameaux, des cônes et du bois du *Cupressus atlantica*, arbre forestier endémique du Maroc. *Phytothérapie.*, 94 : 223-253.

Boussaada O., Ammar S., Saidana D., Chriaa J., Chraif I., Daami M., Helal A.N. et Mighri Z. (2008). Chemical composition and antimicrobial activity of volatile components from capitula and aerial parts of *Rhaponticum acaule* DC growing wild in Tunisia. *Microbiological Research.*, 163: 87-95.

Brian M.L. (1995). The isolation of aromatic materials from plant products. *R.J. Reynolds Tobacco Company, Winston-Salem (USA)*. 57-148.

Briand Y.M. (2009). Une histoire de la résistance aux antibiotiques, à propos de six bactéries. Ed l'Harmattan, Paris.

Bruneton J. (1993). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 2^{ème} édition, Ed. Lavoisier, Paris.

Bruneton J. (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3^{ème} édition, Ed. TEC & DOC, Paris.

Bruneton J. (2009). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 4^{ème} édition, Ed. TEC & DOC-EM Inter, Paris.

Buchbauer G., Adorjan B. (2010). Biological properties of essential oil an updated review. *Flavour and Fragrance Journal.*, 6(25): 407-426.

Buchbauer G., Lang G. (2012). A review on recent research results (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. *Flavour and Fragrance Journal.*,1(27): 13-39.

Burt S.A., Reinders R.D. (2003). Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* 0157:H7. *Letters in Applied Microbiology.*, 36: 162-167.

Burt S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential application in food a review. *International of Food Microbiology.*, 94: 223-253.

Caillet S., Lacroix M. (2007). Les huiles essentielles : leur propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. *INRS-Institut Armand-Frappier, (RESALA):*1-8.

Carlet J.(2016). Réveillons-nous, la résistance aux antibiotiques devient un problème de santé publique dramatique !. *Journal des Anti-infectieux.*, 2(18) : 37-39.

Catier O., Roux D. (2007). Botanique, pharmacognosie, phytothérapie. 3^{ème} édition, Ed Wolters Kluwer, France.

Chahboun N., Abed H., Barrahi M., Amyare R., Ouhsine M., Oudda H., Esmail A. et Berrabeh M. (2015). Evaluation de l'activité bactériostatique d'huile essentielle de la *Lavandula officinalis* vis-à-vis des souches d'origine clinique résistantes aux antibiotiques. *Journal of Materials and Environmental Science.*, 6(4) : 1186-1191.

Chanegriha N., Foudil-cherif Y., Baailouamer A. et Meklati B.Y. (1998). Activité antimicrobienne des huiles essentielles de cyprès et d'eucalyptus Algérien. *Journal of Essential Oil Research:* 11-16.

Chang S.T., Wang S.Y. et Chen P.F.(2005). Antifungal activities of essential oils and their constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) leaves against wood decay fungi. *Bioresource Technology.*, 96: 813-818.

Chang S.T., Cheng S.S., Liu J.Y., Hsu H.Y., Hua K.F. et Chao L.K.(2006). Study on anti inflammatory activity of essential oil from leaves of *Cinnamomum osmophloeum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*, 53:7274-7278.

- Charpin D., Calleja M., Pichot C., Penel V., Hugues B. et Poncet P.(2013).** Allergie au pollen de cyprès. *Revue des maladies respiratoires.*, 10(30): 868-878.
- Chebaibi A., Marouf Z., Rhazi-Filali F., Fahim M. et Ed-dra A. (2016).** Evaluation du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de sept plantes médicinales récoltées au Maroc. *Phytothérapie.*, 6(14): 355-362.
- Chebli B., Achouri M., Idrissi Hassani L.M., et Hmamouchi M.(2003).**Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven moroccan labiatae against *botrytis cinerea* Pers: Fr.*Journal of ethnopharmacology.*,89: 165-169.
- Cheng S.S., Liu J.Y., Tsai K.H., Cheng W.J. et Chang S.T.(2004).** Chemical composition and mosquito larvicidal activity of essential oils from leaves of different *Cinnamomum osmophloeum* provenances. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*, 52: 4395-4400.
- Chéraïf T., Ben Jannet H., Hammami M., Khouja M.L. et Mighri Z. (2007).** Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Cupressus arizonia* green. *Biochemical Systematic and Ecology.*, 12(35): 813-820.
- Chiassonh., Beloin N. (2007).** Les huiles essentielles, des biopesticides «nouveau genre». *Revue de littérature.*, 1(14) : 3-6.
- Couic-Marinier F., Lobstein A. (2013).** Composition chimique des huiles essentielles. *Actualités pharmaceutique.*, 525(52): 22-25.
- Croteau R., Hooper C.L. (1978).** Metabolism of monoterpenes ; acetylation of (-)-Menthol by a soluble enzyme preparation from peppermint (*Mentha piperita*) leaves. *Plant Physiology.*, 61: 737-742.
- Croteau R., Kutchan T.M. et Lewis N.G.(2000).**Natural Products (Secondary Metabolites). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants.*, 24: 1250-1319
- Deans S.G., Ritchie G. (1987).** Antibacterial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology.*, 5: 165-180.
- De Billerbeck V.G. (2007).** Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. *Phytothérapie.*, 5(5): 249-253.

- Degryse A.C., Delpla I. et Voinier M.A.(2008).** Risques et bénéfices possibles des huiles essentielles. *Atelier santé environnement. Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique(EHESP).*
- DelarrasC. (2007).**Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Edition TEC& DOC. Lavoisier, Paris.
- De Sousa Guedes J.P., Da Costa Medeiros J.A., De Souza e Silva R.S., Batista de Sousa J.M., Da Conceição M.L. et De Souza E.L. (2016).** The efficacy of *Mentha arvensis* L. and *M. piperita* L. essential oils in reducing pathogenic bacteria and maintaining quality characteristics in cashew, guava, mango, and pineapple juices. *International Journal of Food Microbiology.*, 238: 183–192.
- Devi W.R., Singh B.C et Singh S.B.(2013).**Antioxidant and anti-dermatophytic properties leaf and bark of *Xylosma longifolium* clos. *BMC Complementary and Alternative Medicine.*, 13(155): 1-9.
- Djenane D., Yanguela J., Amrouche T., Boubrit S., Boussad S. et Roncales P. (2011).** Chemical composition and antimicrobial effects of essential oils of *Eucalyptus globulus*, *Myrtus communis* and *Satureja hortensis* against *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* in minced beef. *Food Science and Technology International.*, 17: 505-515.
- Djenane D., Aïder M., Yangüela J., Idir L., Gómez D. et Roncalés P. (2012).** Antioxidant and antibacterial effects of *Lavandula* and *Mentha* essential oils in minced beef inoculated with *E. coli* O157:H7 and *S.aureus* during storage at abuse refrigeration temperature. *Meat Science.*, 92 (4): 667–674.
- Dorman H.J.D., Deans S.G. (2000).** Antimicrobial agent from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology.*, 88 (2): 308-316.
- El amri J., Elbadaoui K., Zair T., Bouharb H., Chakir S. et Alaoui TI.(2014).** Étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Teucrium capitatum* L et l'extrait de *Siléne vulgaris* sur différentes souches testées. *Journal of Applied Bioscience.*, 82: 7481-7492.
- Fabio A., Cermelli C., Fabio G., Nicoletti P. et Ouaglio P. (2007).**Screening of the antibacterial effect of a variety of essential oils on microorganisms responsible for respiratory infections. *Phytotherapy Reaserch.*, 21: 374-377.

- Farukh S.S., William N.S., Salomiddin J.I. et Michael W. (2015).** Composition and bioactivity of essential oil of *Tanacetum parthenium* from a wild population growing in Tajikistan. *American Journal of Essential Oils and Natural Products.*, 2(4): 32-34.
- Furet A., Bellenot D. (2013).** Les huiles essentielles dans la protection des cultures ; une voie en cours d'exploitation. *Iteipmai, institut technique des plantes aromatiques, médicinales et à parfum* : 1-8.
- Gabriel I., Alleman F., Dufoureq V., Perrin F. et Gabarrou J.F. (2013).** Utilisation des huiles essentielles en alimentation des volailles. 2. Hypothèses sur les modes d'action impliqués dans les effets observés. *INRA Productions Animales.*, 26(1) : 13-24.
- Garneau F.X. (2004).** Le matériel végétal et les huiles essentielles. Manuel pratique. Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation. 1-16.
- Gaudy C., Buxeraud J. (2005).** Antibiotiques ; pharmacologie et thérapeutique. Ed Elsevier, Paris.
- Gharbi Z. (2005).** *Cupressus sempervirens* L. in «A guide to medicinal plants in north Algeria». *IUCN, International Union for Conservation of Nature*: 93-94.
- Guardabassi L., Courvalim P. (2006).** Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance. In: Aerstup F.M. (Ed), antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. *ASM Press: Washington*.1-8.
- Guignard J.L. (1983).** Abrégé de phytochimie. 5^{ème} édition. Ed Masson. Paris. 259P
- Guignard J.L., Cosson L. et Henry M. (1985).** Abrégé de phytochimie. Ed. Masson Paris. 155-174.
- Gul F., Shinwari Z., Imiran A. (2012).** Screening of indigenous knowledge of herbal remedies for skin diseases among local communities of north western Punjab, Pakistan. *Pakistan Journal of Botany.*, 44(5): 1609-1616.
- Guinoiseau E. (2010).** Molécules antimicrobiennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action. Thèse de doctorat à l'université de corse, France.
- Halcon L., Milkus K. (2004).** *Staphylococcus aureus* and wounds: a review of tea tree oil as promising antimicrobial. *American Journal of Infection Control.*, 32: 402-408.
- Hamdani F.Z., Allem R. (2015).** Propriétés antifongiques des huiles essentielles des feuilles de *Citrus* vis-à-vis d'*Alternaria alternata* et *Penicillium sp in vitro*. *Phytotherapie.*, 3: 1-4.

- Hammer K.A., Carson C.F. et Riley T.V.(1999).**Antimicrobial activity of essential oils and other plant extract. *Journal of Applied Microbiology.*, 6(86): 985-990.
- Hammer K.A., Carson C.F., Riley T.V. et Nielsen J.B. (2006).** A review of the toxicity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Food Chemistry Toxicology.*, 44: 616-625.
- Hossaim M.A., Satmi R.S.F. (2016).** *In vitro* antimicrobial potential of crude extract and chemical composition of essential oils of leaves of *Mentha piperita* L native to the Sultanate of Oman. *Pacific Science Review A: Natural Science and Engineering.*, 2(18): 103-106.
- IDIR L. (2010).**Activité antibactérienne de quelques huiles essentielles extraites à partir des espèces végétales de la région de la kabyle. Mémoire de Magister. Université de Boumerdes, Algérie.
- Imelouane B., Amhamdi H., Wathelet J.P., Ankit M., Khedid K. et El Bachiri A.(2009).**Chemical composition of the essential oil of thyme (*Thymus vulgaris*) from Eastern Morocco. *International Journal of Agriculture & Biology.*, 11: 205-208.
- Ismaili R., Lamiri A. et Moustaid K. (2014).** Etude de l'activité antifongique des huiles essentielles de trois plantes aromatiques Marocaine. *International Journal of Innovation and Scientific Reaserch.*, 2(12): 499-505.
- Jouhanneau D.G. (1991).**La médecine des plantes aromatiques: Phyto-aromathérapie et les huiles essentielles de l'océan indien. Ed Azalées, St Denis, 153 p.
- Kalemba D., Kunicka A.(2003).** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry.*, 10: 813-829.
- Ketoh G.K., Glitho I.A., Nuto Y. et Koumaglo H.K. (1998).** Effet de six huiles essentielles sur les œufs et les larves de *Callosobruchus maculatus* F. (coleoptera : bruchidae). *Revue CAMES.*, 00: 16-20.
- Koba K., Sanda K., Raynaud C., Nenonene Y.A.,Millet J. et Chaumont J.P. (2004).**Activités antimicrobiennes d'huiles essentielles de trois *Cymbopogon* sp. Africains vis-à-vis de germes pathogènes d'animaux de compagnie. *Annales de Médecine Vétérinaire.*,148: 202-206.
- Kon K.V., Rai M.K. (2012).**Plant essential oils and their constituents in coping with multidrug-resistance bacteria. *Expert Review of Anti-Infective Therapy.*, 10: 775-790.
- Kumar B., Mali H. et Gupta E. (2014).**Genetic variability, character association, and path analysis for economic traits in menthofuran rich half-sib seed progeny of *Mentha piperita* L. *BioMed Research International:* 1-7.

- Langeveled W.T., Veldhuizen E.J.A. et Burt S.A. (2013).** Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. *Critical Reviews in Microbiology.*, 40: 76-94.
- Lardry J.M., Haberkorn V. (2007).** Les huiles essentielles: principes d'utilisation. *Kinésithérapie Revue.*, 61: 18-23.
- Lemaoui C.E., Layaida H., Badi A. et Foudi N. (2017).** Stratégies de lutte contre la résistance aux antibiotiques. *Journal des Anti-infectieux.*, 1(19) : 12-19.
- Lucchesi M.E. (2005).** Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de doctorat, université de la Réunion, France.
- Lucchesi M.E., Smadja J., Bradshaw S., Louw W. et Chemat F. (2007).** Solvent free microwave extraction of *Elletaria cardamomum* L: A multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil. *Journal of Food Engineering.*, 79:1079-1086.
- Madec J.Y. (2013).** Résistance aux antibiotiques chez l'animal : quel risque pour l'Homme., *Journal des Anti-infectieux.*, 9(15): 178-186.
- Marine P.D., Janačković P., Džamić A.M., Giweli A.A., Soković M. et Ristić M.S.(2013).** The chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of *Salvia fruticosa* growing wild in Libya. *Archives of Biological Sciences.*, 65(1): 321-329.
- Mazari K., Bendimerad N., Bekhechi C. et Fernandez X. (2010).** Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Algerian *Juniperus phoenicea* L. and *Cupressus sempervirens* L. *Journal of Medicinal Plants Research.*, 10(4): 959-964.
- Mehani M., Segni L. (2014).** Effet antimicrobien des huiles essentielles de la plante *Eucalyptus camadulensis* sur certaines bactéries pathogènes. *Annales de Sciences et Technologie.*, 1(6): 85-88.
- Mengel. P., Beh D., Bellido G.M., Monpon B.(1993).** VHMD: extraction d'huile essentielle par micro-ondes. *Parfums Cosmétiques Arômes.*, 114: 66-67.
- Mesaros N., Van Bambeke F., Avrain L., Glupezynski Y., Vanhoof R., Plesiat P. et Tuhlens P.M. (2005).** L'efflux actif des antibiotiques et la résistance bactérienne: état de la question et implications. *La lettre de l'infectiologue.*, 4(20) : 117-126.
- Montewis O. (1985).** Les cyprès. *Afocel-Armef-Information forêt.*, 1: 13-24.
- Moyler D.A.(1993).** Extraction of essential oils with Carbon dioxide. *Flavour and Fragrance Journal.*, 8: 235-247.
- Muylaert A., Mainil J.G.(2012).** Résistance bactérienne aux antibiotiques : les mécanismes et leur «contagiosité». *Annales de Médecine Vétérinaires.*, 156: 109-123.

- Nichane M. (2015).** Contribution à l'étude du dépérissement du cyprès vert (*Cupressus sempervirens* L.) dans les monts de Tararas occidentaux (wilaya de Tlemcen). Thèse de doctorat, université de Tlemcen, Algérie.
- Noudogbessi J.P., Koussou D. et Souhounhloué D.C.K. (2008).** Effet insecticide, ovicide et larvicide des huiles essentielles de *Pimenta racemosa* (Miller) et de *Chromolaena odorata* (L. Robinson) sur le grand capucin (*Prostephanus truncatus* (Horn)) du Maïs. *Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie.*, 26: 41-51.
- Ouedrhiri W., Balouiri M., Bouhdid S., Hark E.H., Moja S. et Greche H. (2017).** Antioxydant and antibacterial activities of *Pelargonium asperum* et *Ormenis mixta* essential oils and their synergistic antibacterial effect. *Environmental Science and Pollution Research:* 1-8.
- Ouraini D., Agoumi A., Alaoui M.I., Alaoui K., Cherrah Y., Benlemlih M., Alaoui Belabbas M. (2005).** Approche thérapeutique des dermatophyties par les huiles essentielles de plantes aromatiques marocaines. *Phytothérapie.*, 1(3): 3-12.
- Oussalah M., Caillet S., Saucier L. et Lacroix M. (2006).** Antimicrobial activity of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat Science.*, 73: 236-244.
- Oussou K.R., Kanko C., Guessend N., Yolou S., GERARD K., Dosso M., N'Guessan Y.T., Figueredo G. et Chalchat J.C. (2004).** Activités antibactériennes des huiles essentielles de trois plantes aromatiques de Côte-D'ivoire. *Comptes Rendus de Chimie.*, 10-11(7) :1081-1086.
- Pattnaik S., Subramanyam S.V.R. et Kole C.(1996).** Antibacterial and antifungal activity of ten essential oils *in vitro*. *Microbios.*, 86 (349): 237-246.
- Piochon M. (2008).** Etude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore Laurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques et hémi-synthèse. Mémoire, Université de Québec à Chicoutimi, Canada.
- Piovetti L., Gonzalez E. et Diara A. (1980).** Diterpene composition of *Cupressus dupreziana* and *Cupressus sempervirens*. *Phytochemistry.*, 12(19): 2772-2773.
- Ponce A.G., Fritz R., Del valle C., Cavaleiro C. et Salgueiro L. (2009).** Antifungal activity of essential oils on the native microflora of organic swiss chard. *Leben-Wissen and technology.*, 36: 679-684.

- Randrianalijaona J.A., Ramanoelina P.A.R., Rasoarzhona J.R.E. et Gaydou E.M. (2005).** Seasonal and chemotype influences on the chemical composition of *Lantana camara* L. essential oils from Madagascar. *Analytica Chimica Acta.*, 1(545): 46-52.
- Riom C. (2010).** Le *Cupressus sempervirens* et approche du concept du pollinier sentielle Nantais. Thèse de doctorat, université de Nantes, France.
- Rodriguez-Martinez J.M., Velasco C., Briales A., Garcia I., Conejo M.C. et Pascual A. (2008).** Qnr-like pentapeptide repeat proteins in gram-positive bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.*, 61: 1240-1243.
- Sakkas H., Papadopoulou C. (2017).** Antimicrobial activity of basil, oregano and thyme essential oils. *Journal of Microbiology and Biotechnology.*, 27(3): 429-438.
- Sangwan N.S., Farooqi A.H.A., Shabih F. et Sangwan R.S. (2001).** Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation.*, 34: 3-21.
- Schelz Z., Molnar J. et Hohmann J. (2006).** Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. *Fitoterapia.*, 4(77): 279-285.
- Sefidkon F., Abbasi K., Jamzad Z. et Ahmadi S. (2007).** The effect of distillation methods and stage of plant growth on the essential oil content and composition of *Satureja Rechingeri* jamzad. *Food chemistry.*, 100: 1054-1058.
- Selim S.A., Adam M.E., Albalawi A.R. et Hassan S.M. (2014).** Chemical composition, antimicrobial and antibiofilm activity of the essential oil and methanol extract of the Mediterranean cypress (*Cupressus sempervirens*). *BMC Complementary and Alternative Medicine.*, 14(179): 1-8.
- Sfeir J., Lefronçois C., Baudoux D., Derbré S. et Licznar P. (2013).** *In Vitro* Antibacterial Activity of Essential Oils against *Streptococcus pyogenes*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*: 1-9.
- Shirner M. (2004).** Huiles essentielles. Description et utilisation de plus de 200 huiles essentielles et huiles végétales. 1^{ère} édition, Gy Trédaniel Editeur, Paris.
- Singh R., Shushni A.M. et Belkheir A. (2015).** Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. *Arabian Journal of Chemistry.*, 3(8): 322-326.
- Sohounhloué C.K.D., Alitonou G., Avlessi F., Bokossa I., Ahoussi E. et Dangou J. (2004).** Composition chimique et activités biologiques de l'huile essentielle de *Lantana camara* linn. *Compte Rendue de Chimie.*, 7: 1101-1105.

- Soković M., Stojković D., Glamočlija J., Ćirić A., Nicolić M., Šiljegović J. et Ristić M.(2013).** Investigation on antibacterial synergism of *Origanum vulgare* and *Thymus vulgaris* essential oils. *Archives of Biological Sciences.*, 65(2): 639-643.
- Suhar K.I., Nielsen P.V. (2003).**Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi. *Journal of Applied Microbiology.*,94(4): 665-674.
- Svoboda K.P., Hampson J.B. (1999).** Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. *Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK, KAG5HW.*
- Tapondjou A.L., Alder C., Fontem D.A., Bouda H. et Reichmuth C. (2005).** Bioactivities of cymol and essential oils of *Cupressus sempervirens* and *Eucalyptus saligna* against *Sitophilus zeamais* Mostschulsky and *Tribolium confusum* du val. *Journal of Stored Products Research.*, 1(41): 91-102.
- Teke G.N., Elisée K.N. et Roger K.J. (2013).** Chemical composition, antimicrobial properties and toxicity evaluation of the essential oil of *Cupressus lusitanica* Mill. leaves from Cameroon. *BMC Complementary & Alternative Medicine.*,13(130): 1-9.
- Tomi F., Sutour S., Bradesi P. et Casanova J. (2011).**Chemical composition of the essential oil from Corsican *Mentha aquatica*- combined analyses by GC(RI), GC-MS and ¹³C NMR spectroscopy. *Natural Product Communications.*, 10(6): 1479-1482.
- Tortora G. J., Funke berdell R. et Case christine L. (2011).**Introduction à La Microbiologie. ERPI Sciences, 2^{ème} édition, Ed Pearson,Québec. 420-428.
- Vidijasagar G.M., Nuzhat T. (2013).**Antifungal investigation on plant essential oils. A review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science.*, 2(5): 19-28.
- Vilela G. R., Almeida G. S., Regitano D'arce M. A. B., Moraes M. H.D., Brito J. O., Da Silva M. F. G.F., Silva S.C., Piedade S.M.S., Calori-Domingues M. A. et Gloria E. M. (2009).**Activity of essential oil and its major compound, 1,8-cineole, from *Eucalyptus globulus* labill, against the storage fungi *aspergillus flavus* link and *aspergillus parasiticus* Speare. *Journal of Stored ProductsResearch.*,45: 108-111.
- Viljoen A.M., Denirci B., Baser K.H.C., Potgieter C.J. et Edwards T.J.(2006).**Microdistillation and essential oil chemistry- a useful tool for detecting hybridisation in *Plectranthus* (lamiaceae). *South African Journal of Botany.*, 72: 99-104.

Vincent R., Le Bâcle C. (2015). Antibiorésistance et conséquences en santé au travail pour les soignants. *Références en santé au travail, INRS.*, 143: 21-43.

Yani A., Piovetti L., Pauly G. et Bernard-Dagan C. (1983). Volatile constituents of the leaves of *Cupressus duperziana* and *Cupressus sempervirens*. *Phytochemistry.*, 4(22): 957-959.

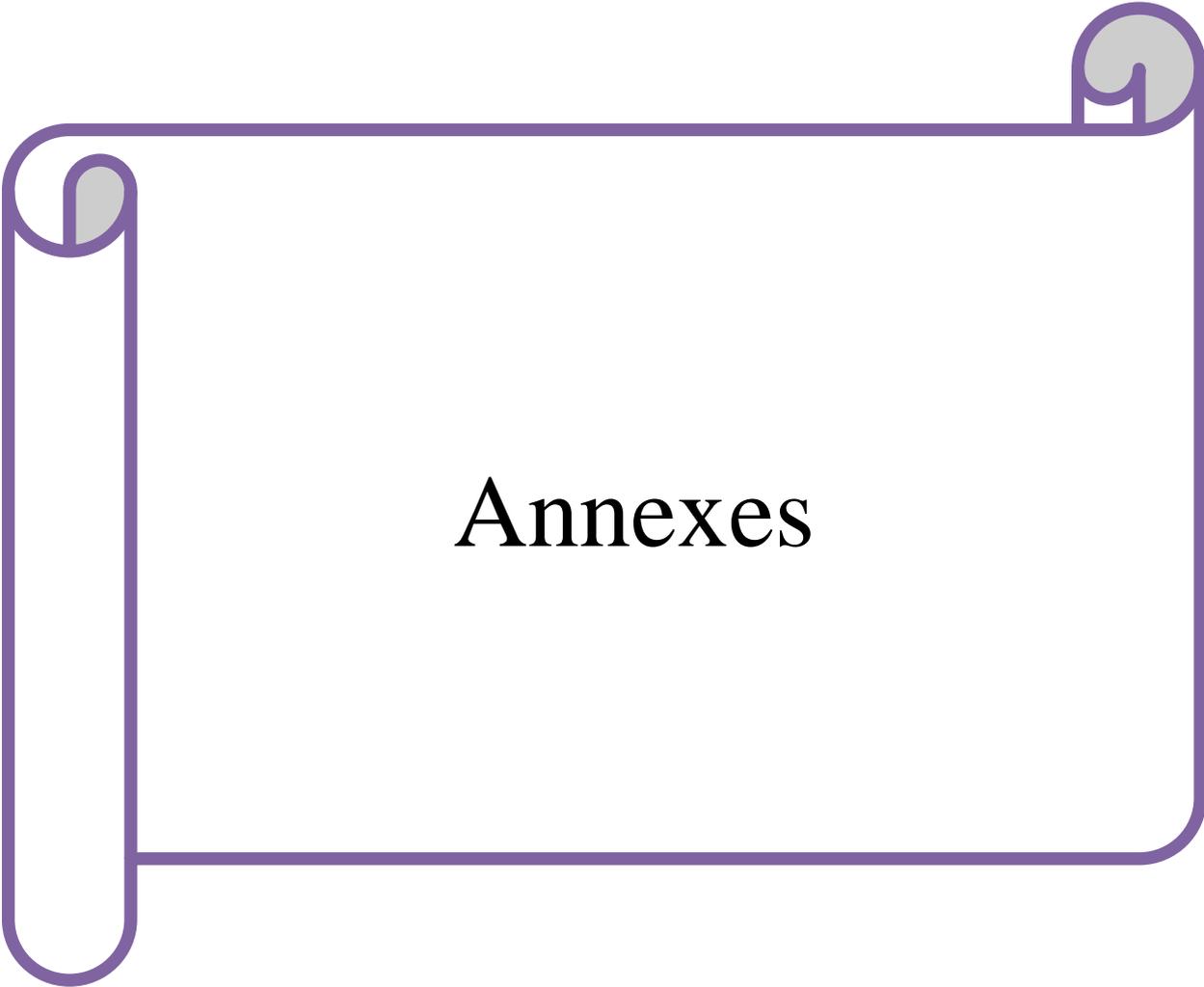
Zahnel G.G., Sniezek G., Schweizer F., Zelenitsky S., Lagace-Wilens P.R.S., Rubinstein E., Gin A.S., Hoban D.J. et Karlowsky J.A. (2009). Ceftaroline: a novel broad-spectrum cephalosporin with activity against Meticillin- resistant *Staphylococcus aureus*. *Drugs.*, 7(69): 809-831.

Zahran H.E.M., Abou-Taleb H.K. et Abdelgaleil S.A.M. (2017). Adulticidal, larvicidal and biochemical properties of essential oils against *Culex pipens* L. *journal of Asia-pacific Entomology.*, 1(20): 133-139.

Zaika L.L. (1988). Spices and Herbs: their antimicrobial activity and its determination. *Journal of Food Safety.*, 9: 97-117.

Zandi-Sohani N., Hojjati M. et Carbonell-Barrachina A.A. (2013). Insecticidal and repellent activities of the essential oil of *Callistemon citrinus* (myrtaceae) against *Callosobruchus maculatus* (F.) (coleopteran: Bruchidea). *Neotropical Entomology.*, 42: 89-94.

Zhiri A. (2006). Les huiles essentielles un pouvoir antimicrobien avéré. *Nutra News.*



Annexes

Annexe I : Composition des solutions et milieux de culture utilisés

❖ Eau physiologique stérile

Composition en g/l :

Chlorure de sodium (NaCl) 9g
Eau distillée 1000ml

pH=7

Stérilisation à 121°C/15min.

❖ Gélose Mueller Hinton (MH)

Composition en g/l

Extrait de viande 3g
Hydrolysate acide de caséine 17,5g
Agar 18g

pH=7,4

Stérilisation à 120°C/15 min

❖ Bouillon Brain Heart Infusion (BHIB)

Composition en g/ml

Protéase-peptone 10g
Infusion de cervelle de veau 12,5g
Chlorure de sodium 2,5g
Phosphate disodique 2,5g
Eau distillée 1000ml

pH=7,4

Stérilisation à 120°C/15 min

❖ Gélose nutritive (GN)

Composition en g/l

Peptone 10g
Extrait de viande 3g
Extrait de levure 3g

Chlorure de sodium	5g
Agar	18g

pH=7,2±0,2

Stérilisation à 120°C/15 min

❖ **Gélose Chapman**

Composition en g/l

Extrait de viande	1g
Extrait de levure	3g
Tryptone	5 g
Peptone bactériologique.....	10g
Mannitol.....	10g
Rouge de	,025g
Agar	15g

pH=7,4

Stérilisation à 120°C/15 min

❖ **Gélose Hecktöen**

Composition en g/l

Peptone pepsique de viande	15 g
Extrait de viande	3g
Extrait de levure	3 g
Lactose	12g
Salicine.....	2g
Saccharose	12g
Chlorure de soduim	5g
Thiosulfate de soduim.....	5g
Citrate de fer ammoniacal.....	1,5g
Sels biliaires.....	4g
Bleu de bromothymol.....	0,064g

Fuschine acide.....0,1g

pH=7,4

Stérilisation à 120°C/ 15 min

❖ Gélose King A

Composition en g/l

Peptone de viande 20g

Glycérol (Glycérine 10ml

Potassum sulfate 1,5g

Agar 20g

pH=7,2

Stérilisation à 120°C/15 min

❖ Gélose Sabouraud

Eau distillée 1000ml

Peptone 10g

Glucose..... 20g

Agar-agar 15g

Annexe II :Résultats du test statistique

Tableau I : Table de l'ANOVA pour les résultats de l'analyse de la variance de la sensibilité des huit bactéries vis-à-vis des deux HES

Effet	Tests Univariés de Significativité pour Diamètre des zones d'inhibition (Feuille) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse					
	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p	Nv_Var
ord. origine	4950,125	1	4950,125	792,0200	0,000000	
Souches bactériennes	567,875	7	81,125	12,9800	0,000016	
huiles essentielles	84,500	1	84,500	13,5200	0,002039	
Souches bactériennes*huiles essentielles	295,500	7	42,214	6,7543	0,000787	
Erreur	100,000	16	6,250			

Tableau II : Table de Newman Keuls pour l'analyse de la variance de la sensibilité des bactéries vis-à-vis des deux HEs.

Test de Newman-Keuls ; variable Diamètre des zones d'inhibition (Feuille)							
Groupes Homogènes, alpha = ,05000 (Recherche Non-Exhaustive)							
Erreur : MC Inter = 6,2500, dl = 16,000							
Cellule N°	Souches bactériennes	huiles essentielles	Diamètre des zones d'inhibition Moyenne	1	2	3	4
11	P.aeruginosa ATCC 27853	<i>Mentha x piperita</i> L.	6,00000	****			
12	P.aeruginosa ATCC 27853	Cupressus sempervirens L.	6,00000	****			
6	E.coli	Cupressus sempervirens L.	6,00000	****			
10	B.cereus ATCC 10876	Cupressus sempervirens L.	9,00000	****			
14	K.pneumoniae	Cupressus sempervirens L.	9,00000	****			
16	A.baumannii	Cupressus sempervirens L.	9,50000	****			
1	E.coli ATCC 25922	<i>Mentha x piperita</i> L.	10,00000	****			
2	E.coli ATCC 25922	Cupressus sempervirens L.	11,00000	****			
15	A.baumannii	<i>Mentha x piperita</i> L.	12,00000	****	****		
3	S.aureus ATCC 25923	<i>Mentha x piperita</i> L.	12,50000	****	****		
5	E.coli	<i>Mentha x piperita</i> L.	13,00000	****	****		
13	K.pneumoniae	<i>Mentha x piperita</i> L.	13,50000	****			
8	S.aureus	Cupressus sempervirens L.	15,00000	****	****	****	
9	B.cereus ATCC 10876	<i>Mentha x piperita</i> L.	20,00000		****	****	****
4	S.aureus ATCC 25923	Cupressus sempervirens L.	21,00000			****	****
7	S.aureus	<i>Mentha x piperita</i> L.	25,50000				****

Tableau III : Table de l'ANOVA pour les résultats de l'analyse de la variance de la sensibilité des deux souches fongiques vis-à-vis des deux HEs.

Effet	Tests Univariés de Significativité pour Diamètre des zones d'inhibition (Feuille de données1)				
	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	2592,000	1	2592,000	150,2609	0,000254
Souches fongiques	98,000	1	98,000	5,6812	0,075699
Huiles essentielles	12,500	1	12,500	0,7246	0,442588
Souches fongiques*Huiles essentielles	220,500	1	220,500	12,7826	0,023266
Erreur	69,000	4	17,250		

Tableau IV : Table de Newman Keuls pour l'analyse de la variance de la sensibilité des deux souches fongiques vis-à-vis des deux HEs.

Test de Newman-Keuls ; variable Diamètre des zones d'inhibition (Feuille de données1)						
Groupes Homogènes, alpha = ,05000						
Erreur : MC Inter = 17,250, dl = 4,0000						
Cellule N°	Souches fongiques	Huiles essentielles	Diamètre des zones d'inhibition Moyenne	1	2	Nv_Var
1	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Mentha x piperita</i> l	8,00000	****		
4	<i>Candida albicans</i>	<i>Cupressus sempervirens</i> l	17,50000	****	****	
2	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Cupressus sempervirens</i> l	21,00000	****	****	
3	<i>Candida albicans</i>	<i>Mentha x piperita</i> l	25,50000		****	

Annexe III : Résultats des CMI

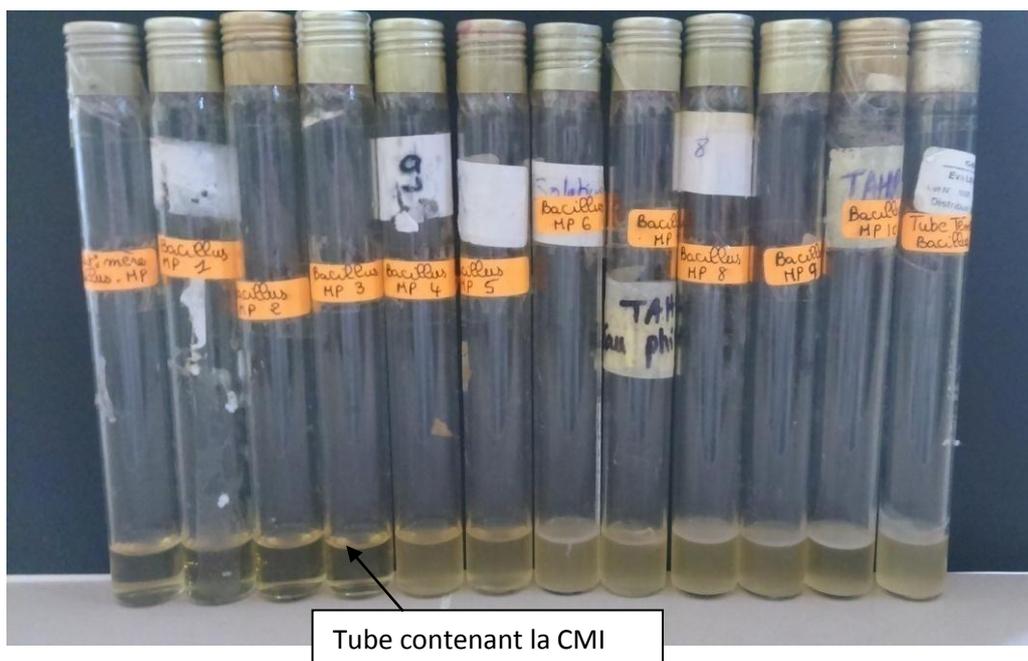


Figure I : Photographie de la série de dilutions réalisée afin de déterminer la CMI en milieu liquide de l'HE de *Mentha x piperita* L sur la souche *Bacillus cereus* ATCC 10876.



Figure II : photographie de la série de dilution réalisée afin de déterminer la CMI en milieu liquide de l'HE de *Mentha x piperita* L sur la souche *Escherichia coli* d'origine clinique.



Figure III : Photographie de la série de dilution réalisée afin de déterminer la CMI en milieu liquide de l'HE de *Cupressus sempervirens* L. sur la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

