

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

Université Mouloud MAMMERI de TIZI-OUZOU
Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques
Département de Biochimie-Microbiologie



MEMOIRE

de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie appliquée

Thème

**Evaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles
d'*Origanum compactum* et *Cedrus atlantica* : Application
pour la conservation des fruits de pomme**

Réalisé par :

- M^{lle} KELLAL Cylia
- M^{lle} LACETE Dyhia

Devant le jury :

PRESIDENT :	M ^r TAZDAIT D.	Maitre de conférences B à l'UMMTO
PROMOTEUR :	M ^r OUELHADJ A.	Maitre de conférences A à l'UMMTO
EXAMINATRICE :	M ^{me} BENAZOUZ K.	Maitre assistante A à l'UMMTO
EXAMINATEUR :	M ^r SEBANE H.	Maitre assistant A à l'UMMTO

Année universitaire : 2017/2018

Remerciements

Au terme de ce travail, il nous est agréable de remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.

Nous tenons à remercier chaleureusement notre promoteur de mémoire, le **Docteur OUELHADJ A.**, maitre de conférences A à l'université Mouloud MAMMERI de Tizi-Ouzou, qui nous a guidés dans la rédaction de ce manuscrit. Merci pour vos précieux conseils, ta disponibilité, et d'avoir mis à notre disposition le matériel nécessaire à la réalisation de ce travail. Soyez assuré de notre sincère estime, Vous avez tous nos respects.

On remercie vivement l'ensemble du jury qui nous a fait l'honneur de juger ce travail :

M^r TAZDIAT D., maitre de conférences B à l'UMMTO, pour nous avoir fait l'honneur de présider nôtre jury.

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

M^r SEBANE H., maitre assistant A à l'UMMTO, d'avoir accepté de faire partie de notre jury et de participer à l'évaluation de notre travail.

On désir remercier le personnel de Laboratoire Pédagogique Commun de Microbiologie, Université mouloud MAMMERI de Tizi-Ouzou, Faculté des Sciences Biologiques et Sciences Agronomiques dans lequel ce travail a été réalisé, pour la sympathie qu'ils nous ont témoignée.

Dieu merci pour nous avoir permis d'arriver à notre objectif et de présenter cet humble travail.

Dédicace

Avec l'aide de bon DIEU, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie à :

Mes chers parents : Hocine & Nadia

Mon frère, ma sœur, mon mari Omar

Pour leur présence de tous les instants ;

Pour le soutien qu'ils m'ont apporté ;

Avec toute mon affection et ma reconnaissance.

Cylia

Dédicace

Avec l'aide de bon DIEU, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie à :

Mes chers parents : Lounès & Fatiha

Mes frères, mes sœurs, mes amis, et mes cousines

Pour leur présence de tous les instants ;

Pour le soutien qu'ils m'ont apporté ;

Avec toute mon affection et ma reconnaissance.

Dyhia

Liste des abréviations

A. niger : *Aspergillus niger*

ATCC : American Type Culture Collection

B. cereus : *Bacillus cereus*

BHIB : Brain Heart Infusion Borth

C. albicans : *Candida albicans*

C. atlantica : *Cedrus atlantica*

CMB : Concentration Minimale Bactéricide

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

DMSO : Dimethylsulfoxyde

DO : Densité Optique

E. coli : *Escherichia coli*

MH : Mueller Hinton

O. compactum : *Origanum compactum*

P. aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa*

PDA : Potato Dextrose Agar ; Gélose dextrosée à la pomme de terre

pH : potentiel Hydrogène

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

UFC : Unité Formant Colonie

V/V : Volume/Volume

Liste des tableaux et figures

Liste des tableaux

Tableau I : Tableau descriptif des différentes souches utilisées pour le test de l'activité antimicrobienne des deux huiles essentielles.....	27
Tableau II : Tableau descriptif des milieux de cultures utilisés.....	28
Tableau III : Antibiotiques et antifongique utilisés et leurs valeurs des diamètres des zones d'inhibitions	29
Tableau IV : Appareils utilisés	30
Tableau V : Valeurs des dilutions utilisées pour déterminer les CMI.....	36
Tableau VI : Caractères morphologiques des souches bactériennes testées	41
Tableau VII : Caractères macroscopiques et microscopiques d' <i>Aspergillus niger</i>	42
Tableau VIII : Tableau récapitulatifs des zones d'inhibition des témoins positifs (en mm).....	45
Tableau IX : Résultats des diamètres des zones d'inhibition en mm (moyenne $\pm$ écart type) de l'activité antibactérienne de l'HE de <i>C. atlantica</i>	47
Tableau X : Résultats des diamètres des zones d'inhibition en mm (moyenne $\pm$ écart type) de l'activité antibactérienne de l'HE d' <i>Origanum compactum</i>	49
Tableau XI : Résultats des diamètres des zones d'inhibition en mm (moyenne $\pm$ l'écart type) de l'activité anti- <i>Candida</i> des deux huiles essentielles.....	63

Liste des figures

Figure 1 : Montage de la technique d'hydrodistillation	7
Figure 2 : Montage de distillation par entraînement à la vapeur	8
Figure 3 : Montage de l'hydrodiffusion	9
Figure 4 : Photographie de <i>Cedrus atlantica</i>	13
Figure 5 : Photographie d' <i>Origanum compactum</i>	15
Figure 6 : Mécanisme d'action du carvacrol sur la membrane cytoplasmique bactérienne....	20
Figure 7 : Photographies des témoins négatifs des souches de références et cliniques testées pour l'activité antibactérienne des deux HEs	43
Figure 8 : Photographies des témoins positifs des souches de références et cliniques testées vis-à-vis les antibiotiques	44
Figure 9 : Photographies des résultats du test de sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis de l'huile essentielle de <i>Cedrus atlantica</i>	46
Figure 10 : Photographies du test de sensibilité des souches bactériennes de références vis-à-vis de l'huile essentielle d' <i>Origanum compactum</i>	48
Figure 11 : Photographies du test de sensibilité des souches bactériennes cliniques vis-à-vis de l'huile essentielle d' <i>Origanum compactum</i>	49
Figure 12 : Série de dilution réalisée afin de déterminer la CMI en milieu liquide de l'HE d' <i>Origanum compactum</i> sur la souche <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	53
Figure 13 : Série de dilution réalisée afin de déterminer la CMI en milieu liquide de l'HE d' <i>Origanum compactum</i> sur la souche <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	54
Figure 14 : Série de dilution réalisée afin de déterminer la CMI en milieu liquide de l'HE d' <i>Origanum compactum</i> sur la souche <i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	54
Figure 15 : Série de dilutions décroissante en concentration d'HE d' <i>Origanum compactum</i> en milieu liquide (BHIB) sans suspension bactérienne ainsi le témoin positif et négatif	55

Figure 16 : Résultat d'ensemencement des échantillons tiré du tube n°6 (A) et du tube n°4 (B) où il n'y a pas eu de croissance bactérienne visible de la souche <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	56
Figure 17 : Résultat d'ensemencement des échantillons tiré du tube n°5 (A) et de tube n°3 (B) où il n'y a pas eu de croissance bactérienne visible de la souche <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	57
Figure 18 : Résultat d'ensemencement d'un échantillon tiré du tube n°7(A) et de tube de la solution mère (B) où il n'y a pas eu de croissance bactérienne visible de la souche <i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	57
Figure 19 : Photographies du test de sensibilité de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, <i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876 et <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 vis-à-vis la combinaison de l'HE d' <i>Origanum compactum</i> (50%) et <i>Cedrus atlantica</i> (50%)	59
Figure 20 : Photographies du test de sensibilité de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, <i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876 et <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 vis-à-vis la combinaison de l'HE d' <i>Origanum compactum</i> (25%) et <i>Cedrus atlantica</i> (75%)	60
Figure 21 : Photographies du test de sensibilité de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, <i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876 et <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 vis-à-vis la combinaison de l'HE d' <i>Origanum compactum</i> (75%) et <i>Cedrus atlantica</i> (25%)	61
Figure 22 : Photographies de témoin négatif et de témoin positif de <i>Candida albicans</i> testée pour l'activité antifongique des deux HEs issues de : <i>Origanum compactum</i> et <i>Cedrus atlantica</i>	62
Figure 23 : Photographies de sensibilité de <i>C. albicans</i> testée pour l'activité antifongique des deux HEs issues de : <i>Origanum compactum</i> et <i>Cedrus atlantica</i>	63
Figure 24 : Série de dilution réalisée afin de déterminer la CMI en milieu liquide de l'HE d' <i>O.compactum</i> sur la souche <i>Candida albicans</i>	64
Figure 25 : Résultats d'ensemencement des échantillons tirés des tubes de la série de dilution où il n'y a pas eu de croissance bactérienne visible de la souche <i>C.albicans</i>	65
Figure 26 : Photographies de témoin négatif d' <i>Aspergillus niger</i> et son test de sensibilités vis-à-vis de l'huile essentielle de <i>C. atlantica</i>	66

Figure 27 : Photographies de témoin négatif d'*Aspergillus niger* et son test de sensibilités vis-à-vis de l'huile essentielle d'*O. compactum*67

Figure 28 : Photographies des tests de sensibilités d'*A.niger* vis-à-vis de l'HE d'*O. compactum* appliquée sur des fruits de pomme ainsi le témoin négatif69

Table des matières

Table des matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Résumé

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

1^{re} partie : Revue 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
3. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles	4
4. Composition chimique des huiles essentielles.....	4
4.1. Terpènes et dérivés.....	5
4.1.1. Les monoterpènes	5
4.1.2. Les sesquiterpènes	6
4.2. Composés aromatiques dérivés du phénylpropane	6
5. Procédés d'extraction des huiles essentielles	6
5.1. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau	6
5.1.1. Hydrodistillation simple.....	7
5.1.2. Distillation à vapeur saturée.....	7
5.1.3. Hydrodiffusion (percolation).....	8
5.2. Extraction par CO ₂ supercritique	9
5.3. Extraction par solvant.....	9
5.4. Expression à froid	10
5.5. Extraction assistée par micro-onde	10
5.5.1. Hydrodistillation ou extraction par solvant classique assistée par chauffage micro-onde	10

5.5.2. Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes (ESSAM).....	11
6. Conservation et stockage des huiles essentielles	11
7. Toxicités des huiles essentielles	11

Chapitre II : Description de : *Cedrus atlantica* et *Origanum compactum*

1. Présentation de <i>Cedrus atlantica</i>	
1.1. Noms habituels.....	13
1.2. Classification botanique	13
1.3. Description botanique.....	13
1.4. Habitat et répartition géographique.....	14
1.5. Usages traditionnel.....	14
1.6. Huile essentielle de cèdre	14
2. Présentation de l' <i>Origanum compactum</i>	15
2.1. Noms habituels.....	15
2.2. Classification botanique	15
2.3. Description botanique.....	16
2.4. Habitat et répartition géographique.....	16
2.5. Usages traditionnel.....	16
2.6. Huile essentielle d'origan	17

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

1. Activités biologiques des huiles essentielles	18
1.1. Activité antimicrobienne	18
1.1.1. Activité antifongique	18
1.1.2. Activité antifongique	20
1.1.3. Activité Antivirale	22
1.2. Activité anti-tumorale	22
1.3. Activité anti-oxydante.....	23
1.4. Activité anti-inflammatoire.....	23

2. Domaines d'utilisation des huiles essentielles.....	24
2.1. Aromathérapie.....	24
2.2. Cosmétologie et parfumerie	24
2.3. Industrie Pharmaceutique.....	25
2.4. Industrie agro-alimentaire.....	25

2^e partie : Étude expérimentale

I. Matériel et methodes

1. Matériel	26
1.1. Huiles essentielles testées.....	26
1.2 . Souches microbiennes testées.....	27
1.3. Milieux de culture utilisés	28
1.4. Antibiotiques et antifongique utilisés.....	29
1.5. Émulsifiant utilisé	30
1.6. Appareillage.....	30
2. Méthodes	31
2.1. Tests de revivification microbiologique des souches bactériennes.....	31
2.2. Tests de confirmation microbiologiques de la pureté des souches microbiennes....	31
2.2.1. Repiquage sur les milieux sélectifs	31
2.2.2. Examens microscopiques.....	31
2.3. Étude de l'activité antibactérienne des deux huiles essentielles.....	33
2.3.1. Pré-enrichissement des souches bactériennes.....	33
2.3.2. Préparation des suspensions bactériennes.....	33
2.3.3. Évaluation de l'activité antibactérienne <i>in vitro</i> des deux huiles essentiels.....	33

2.3.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'huile d'origan.....	35
2.3.5. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) de l'huile d'origan.....	36
2.3.6. Étude de l'effet de la combinaison des deux huiles essentielles.....	37
2.3.6.1. Test de sensibilité des trois souches bactériennes vis-à-vis de la combinaison des deux huiles essentielles avec une proportion de : 50% de l'HE d'origan compact + 50% de l'HE de cèdre d'Atlas.....	37
2.3.6.2. Test de sensibilité des trois souches bactériennes vis-à-vis de la combinaison des deux huiles avec une proportion de : 75% de l'HE d'origan compact + 25% de l'HE du cèdre.....	37
2.3.6.3. Test de sensibilité de trois souches bactériennes vis-à-vis de la combinaison des deux huiles avec une proportion de : 25% de l'HE d'origan compact + 75% de l'HE du cèdre.....	38
2.4. Étude de l'activité antifongique des deux huiles essentielles	38
2.4.1. Préparation des suspensions fongiques.....	38
2.4.2. Évaluation de l'activité antifongique des deux huiles essentielles <i>in vitro</i> ...	38
2.4.2.1. Activité anti- <i>Candida</i> des deux huiles essentielles.....	38
2.4.2.2. Activité anti- <i>Aspergillus</i> des deux huiles essentielles.....	39
2.4.3. Évaluation de l'activité anti- <i>Aspergillus</i> de l'huile d'origan compact <i>in vivo</i>	
2.4.3.1. Matrice alimentaire utilisée	39
2.4.3.2. Préparation des pommes.....	40

II. Résultats et discussion

1. Résultats des tests de vérification des souches bactériennes.....	41
2. Résultats des témoins réalisés par la méthode de diffusion sur gélose.....	43
2.1. Résultats des témoins négatifs réalisés avec le DMSO.....	43
2.2. Résultat des témoins positifs (Antibiogramme).....	43

3. Résultats du test de sensibilité des souches bactériennes aux deux huiles essentielles.....	46
3.1. Résultats du test de sensibilité des souches bactériennes à l'HE de <i>Cedrus atlantica</i>	46
3.2. Résultats du test de sensibilité des souches bactériennes à l'HE d' <i>Origanum compactum</i>	48
4. Résultats des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'huile essentielle d' <i>Origanum compactum</i>	52
5. Résultats de la nature de l'activité de l'huile essentielle d' <i>O.compactum</i> (CMB).....	56
6. Résultats de la combinaison des deux huiles essentielles.....	59
6.1. Résultats de la combinaison de l'HE d' <i>Origanum compactum</i> (50%) et <i>Cedrus atlantica</i> (50%).....	59
6.2. Résultats de la combinaison de l'HE d' <i>Origanum compactum</i> (25%) et <i>Cedrus atlantica</i> (75%).....	59
6.3. Résultats de la combinaison de l'HE d' <i>Origanum compactum</i> (75%) et <i>Cedrus atlantica</i> (25%).....	60
7. Activité antifongique des deux huiles essentielles.....	62
7.1. Résultats de l'activité anti- <i>Candida</i> des deux huiles essentielle.....	62
7.1.1. Résultats de témoin négatif et de témoin positif de <i>Candida albicans</i>	62
7.1.2. Résultats de sensibilité de <i>C. albicans</i> vis-à-vis des deux huiles essentielles.....	63
7.1.3. Résultats de CMI de l'huile essentielle d' <i>Origanum compactum</i>	64
7.2. Résultats de l'activité anti- <i>Aspergillus</i> des deux huiles essentielle.....	66
7.2.1. Résultats de sensibilité d' <i>Aspergillus niger</i> de vis-à-vis huile essentielle de <i>C.atlantica</i>	66

7.2.2. Résultats de sensibilité d' <i>Aspergillus niger</i> vis-à-vis de l'huile essentielle d' <i>O.compactum</i>	67
8. Résultats de l'activité anti- <i>Aspergillus in vivo</i> de l'huile d'origan compact.....	69
Conclusion et perspectives	71

Références bibliographiques

Annexe

Introduction

Actuellement, la recherche de nouvelles substances antimicrobiennes purement naturelles est la préoccupation capitale de la plupart des chercheurs vus l'émergence de la résistance microbienne aux antibiotiques. Les huiles essentielles extraites de certaines plantes aromatiques ont prouvé, à ce même titre, leur valeur inestimable pour la santé, donc, connaissant le nombre de plantes à huiles essentielles et leur diversité, il est tout à fait compréhensible de continuer des travaux dans ce domaine. Depuis ce temps, l'utilisation des huiles essentielles s'est développée jusqu'à devenir depuis plus d'une vingtaine d'années, une sérieuse alternative à la médecine des antibiotiques dans les pathologies infectieuses (CHEBAIBI *et al.*, 2016).

Cependant, la connaissance des plantes et l'étude de leurs propriétés, leurs effets thérapeutiques se révèlent une nécessité primordiale, pour découvrir de nouveaux principes actifs pouvant annoncer une révolution de la médecine. Les huiles essentielles sont donc devenues une matière première de valeur très estimable attirant de plus en plus les chercheurs (CHEBAIBI *et al.*, 2016).

Actuellement, les huiles essentielles représentent un outil très intéressant pour augmenter la durée de conservation des produits alimentaires. Ces substances naturelles riches en composés antimicrobiens et antioxydants sont considérées comme alternative importante pour résoudre le problème d'altération post-récolte liée aux moisissures et d'éviter la perte en qualité et en quantité des fruits pendant l'entreposage. Toutefois, les pommes entreposées dans les frigos subissent malheureusement des détériorations suite aux problèmes phytosanitaires engendrant des pertes importantes, occasionnés essentiellement par des maladies d'origine fongique, ce qui agit sur le prix de vente et la qualité des pommes. Ces agents fongiques responsables de ces maladies, produisent également des mycotoxines qui peuvent être mutagènes (SERRANO *et al.*, 2008 ; LAGHCHIMI *et al.*, 2014).

Cette présente étude vise à tester l'activité antibactérienne *in vitro* de deux huiles essentielles provenant de deux plantes aromatiques : *Origanum compactum* (origan compact) et *Cedrus atlantica* (cèdre) vis-à-vis des souches bactériennes de références et des souches cliniques résistante. Ensuite une évaluation de leur activité antifongique *in vitro* est étudié vis-à-vis les souches : *Candida albicans* et *Aspergillus niger*, suivi

d'une application de l'huile d'origan sur des fruits de pomme altéré par *Aspergillus niger* qu'est effectuée par deux méthodes : par contact direct et par micro-atmosphère.

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

Dans une première partie, une revue bibliographique sera présentée sur les huiles essentielles notamment leurs activités biologiques, et une description des espèces végétales utilisées dans ce travail.

La deuxième partie du manuscrit présentera l'étude expérimentale où nous présenterons le matériel et méthodes utilisés afin d'évaluer l'activité antimicrobiennes *in vitro* et *in vivo* des deux huiles essentielles.

Enfin, les résultats obtenus de l'activité antibactérienne et antifongique des huiles essentielles sont interprétés à la lumière de la littérature. L'étude est clôturée par une conclusion et des perspectives.

1^{re} partie :

Revue
bibliographique

Chapitre I :

Généralités sur les huiles essentielles

1. Définition des huiles essentielles

Les huiles essentielles (HEs) appelées aussi essences, sont des mélanges de substances aromatiques produites par de nombreuses plantes et présentes sous la forme de minuscules gouttelettes dans les feuilles, la peau des fruits, la résine, les branches, le bois. Elles sont présentes en petites quantités par rapport à la masse du végétal : elles sont odorantes et très volatiles (PADRINI et LUCHERONI, 2003).

Le terme « huile » se rapportant à leur caractère hydrophobe et visqueux, tandis que le terme « essence » est utilisé pour désigner les molécules odoriférantes contenues dans la plante et aussi le caractère inflammable. Quant au terme « essentielle » se comprenant comme étant la caractéristique principale et typique de la fragrance de ces substances (BOUKHOBZA et GOETZ, 2014).

Selon BRUNETON (2009) et THOMAR (2011), les HEs sont souvent décrites comme des métabolites secondaires des plantes, d'une composition chimique complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par hydrodistillation.

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

Les HEs n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs et peuvent être stockées dans les organes suivant : fleurs (bergamotier, tubéreuse), feuilles (citronnelle, laurier), les écorces (cannelier), des bois (bois de rose), les racines (vétiver), des fruits (anis, badiane), les graines (muscade) (KALOUSTIAN et MINAGLOU, 2012).

Selon BRUNETON (1993), la synthèse et l'accumulation des HEs sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées, souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante : cellules à HEs des Lauraceae, poils sécréteurs des Lamiaceae, poches sécrétrices des Myrtaceae ou des Rutaceae, canaux sécréteurs des Apiaceae ou des Asteraceae. Elles peuvent être présentes à la fois dans des différents organes de la plante mais la composition de l'HE varie d'un organe à un autre.

Les HEs permettent, entre autres, à la plante de se défendre contre les agressions extérieures en présentant des propriétés antiseptiques dirigées contre les parasites du sol et des propriétés inhibitrices sur la germination des grains sur le sol. Elles ont des propriétés

répulsives ou attractives vis-à-vis des insectes. Elles interviennent aussi dans la pollinisation en attirant certains insectes favorisant ainsi la dispersion du pollen et des graines (BAKKALI *et al.*, 2008 ; KALOUSTIAN et MINAGLOU, 2012).

3. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles

D'après BARDEAU (2009), les propriétés physico-chimiques des HEs dépendent de plusieurs facteurs, comme par exemple les conditions environnementales et climatiques, la saison de la cueillette des plantes, les conditions de stockage, la méthode utilisée pour leurs extractions et les conditions d'analyses employées pour l'identification des constituants de ces huiles. Ces propriétés peuvent être résumées comme suit : les HEs sont généralement incolores, mais cela dit elles possèdent une teinte jaune pâles lorsqu'elles viennent d'être préparées et certaines peuvent être colorées par exemple : l'HE cannelle à une coloration rougeâtre.

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 inférieure à celle de l'eau (inférieure 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 ; MARINE *et al.*, 2013).

4. Composition chimique des huiles essentielles

D'après HUERTA (2012), la composition chimique des HEs est souvent complexe qui leur confère toutes leurs propriétés, elles peuvent être composés d'une centaine de molécules. Les HEs pures et naturelles sont les seules à posséder la bonne concentration de composés chimiques, et donc les propriétés adéquates.

Généralement, on trouve de nombreux constituants dans une HE, appartenant principalement à deux grands groupes chimiques : les composés terpéniques et les composés aromatiques dérivés du phénylpropane.

4.1. Terpènes et dérivés

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structure cyclique ou de chaîne ouverte. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'unités isoprénique à 5 atomes de carbone (C_5H_8). Ils sont subdivisés selon le nombre d'unités isoprènes en : monoterpènes formés de deux isoprènes ($C_{10}H_{16}$), les sesquiterpènes, formés de trois isoprènes ($C_{15}H_{24}$), les diterpènes, formés de quatre isoprènes ($C_{20}H_{32}$). Les tetraterpènes sont constitués de huit isoprènes qui conduisent aux caroténoïdes. Les polyterpènes ont pour formule générale : $(C_5H_8)_n$ ou n peut être de 9 à 30 (BAKKALI *et al.*, 2008).

4.1.1. Les monoterpènes

Les molécules monoterpéniques ont de faibles poids moléculaire et s'évaporent rapidement. Elles s'oxydent facilement pour donner des alcools terpéniques, tandis que les terpénoides représentent des terpènes oxygénés. Il existe plus de 900 monoterpènes connus qui se trouvent principalement dans 3 catégories structurales : ils peuvent être acycliques (myrcène, ocimène), monocycliques (α - et γ -terpinène, *p*-cymène) ou bicycliques (pinènes, 3-carène, camphène, sabinène). Ils constituent parfois plus de 90% d'HEs : Citrus, térébenthines (BRUNETON, 1993 ; BUCKLE, 1997).

Bien que les terpènes, au sens strict, ne soient que des hydrocarbures, il existe de nombreux dérivés possédant une ou plusieurs fonctions. Ils sont considérés comme des composés terpéniques ou terpénoïdes : alcools acycliques (linalol), monocycliques (menthol), bicyclique (bornéol) ; aldéhydes (citral ou mélange de néral et de géraniol) ; cétones (menthone, camphre) ; esters (acétate de linalyle) ; éthers ou oxydes (1,8-cinéole ou eucalyptol) ; phénols (thymol, carvacrol) ; peroxydes (ascaridole) (KALOUSTIAN et MINAGLOU, 2012).

4.1.2. Les sesquiterpènes

Sont des dérivés d'hydrocarbures en $C_{15}H_{22}$ (alliance de trois unités isoprènes). C'est la classe la plus variée des terpènes qui se répartissent en divers catégories structurales : acycliques (Nerolidol), monocycliques (Bisabolene), bicycliques (Caryophyllene), tricycliques (Cedrene), polycycliques. On trouve les sesquiterpènes sous forme d'hydrocarbures ou sous forme d'hydrocarbures oxygénés dans la nature comme les alcools, les cétones, les aldéhydes, les acides et les lactones (SOUALEH et SOULIMANI, 2016).

Ils sont légèrement hypotenseurs, calmants et anti-inflammatoires mais peuvent être néphrotoxiques (MARINE *et al.*, 2013).

4.2. Composés aromatiques dérivés du phénylpropane

Une autre catégorie de composés volatils qu'on rencontre assez souvent est celle des composés aromatiques dérivés du phénylpropane. Ce groupe des dérivés du phénylpropane ($C_6H_5-CH_2-CH_2-CH_3$) est moins fréquents que les terpènes et leurs dérivés (SANGWAN *et al.*, 2001).

La biosynthèse concerne le précurseur de cette série qui est l'acide shikimique qui conduira aux dérivés de l'acide cinnamique. Ce deuxième groupe est constitué par : des aldéhydes (cinnamaldéhyde) et des dérivés méthoxylés, ainsi que des allyphénols (eugénol), des propénylphénols (anéthole). Il existe aussi des lactones ou esters cyclique (la coumarine) formés à partir de dérivés de l'acide cinnamique. Parfois, la chaîne aliphatique est réduite à un seul atome de carbone (par exemple, la vanilline) (KALOUSTIAN et MINAGLOU, 2012).

5. Procédés d'extraction des huiles essentielles

5.1. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau

Les procédures d'extraction par l'entraînement à la vapeur d'eau sont fondées sur le fait que la plupart des constituants volatils enfermés dans les végétaux sont entraînaibles par la vapeur d'eau, vu leur point d'ébullition assez bas et leur nature hydrophobe (BRUNETON,

1993). Pour cela trois variantes sont possible selon la texture et la fragilité de la matière à traiter.

5.1.1. Hydrodistillation simple

Le matériel végétal à traiter (intact ou éventuellement broyé) est mise en contact avec l'eau dans un ballon lors d'une extraction au laboratoire ou dans un alambic industrielle. Le tout est ensuite porté à l'ébullition. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et les HEs se séparent de l'eau par différence de densité (BRUNETON, 2009 ; BOUKHOBZA et GOETZ, 2014).

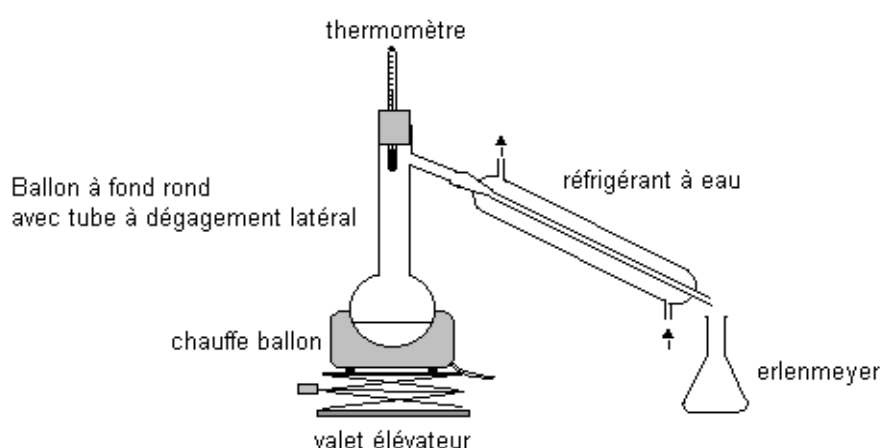


Figure 1 : Montage de la technique d'hydrodistillation (PELLERIN, 2000).

5.1.2. Distillation à vapeur saturée

Dans cette technique, le végétal n'est pas en contact avec l'eau : la vapeur d'eau est injectée au travers de la masse végétale disposée sur des plaques perforées (BRUNETON, 2009). Cela permet d'éviter les altérations hydrolytiques (particulièrement des esters) liées à l'ancien procédé de distillation ; ce qui constitue une nette amélioration quant à la qualité des HEs obtenues. L'essence aromatique, devenue HE en raison des transformations liées aux paramètres de la distillation (oxygène, eau, vapeur d'eau et température), et l'eau distillée, circulant dans le serpentin de l'alambic, s'écoulent et se séparent dans l'essencier, un récipient muni de deux orifices. Celui du haut permet de recueillir l'HE, en général plus légère que l'eau, et celui du bas laisse s'écouler l'hydrolat.

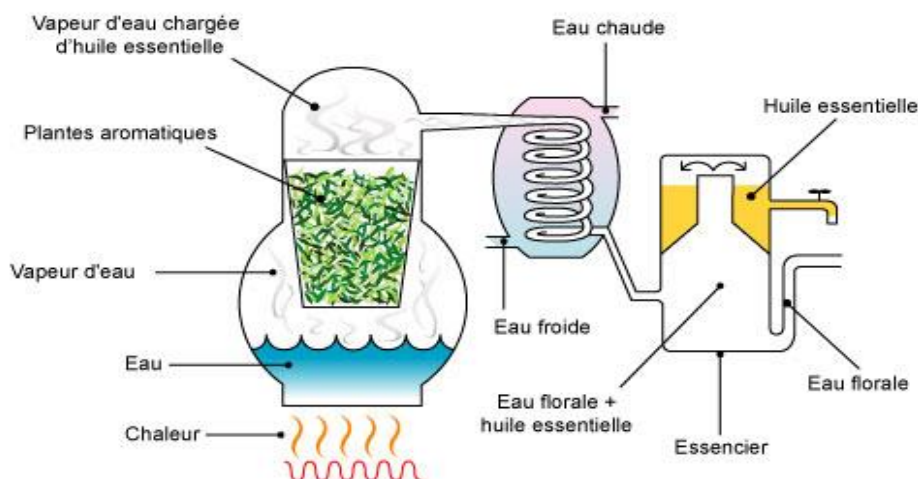


Figure 2 : Montage de distillation par entraînement à la vapeur (PELLERIN, 2000).

5.1.3. Hydrodiffusion (percolation)

L'hydrodiffusion consiste à pulser de la vapeur d'eau à très faible pression (0,02-0,15 bar) à travers la masse végétale, du haut vers le bas (BRUNETON, 2009). Cette technique exploite ainsi l'action osmotique de la vapeur d'eau. Elle présente pour certaines plantes (les conifères par exemple ou encore la cannelle) l'avantage d'être plus rapide et par conséquent, moins susceptible de transformer la qualité des HEs recueillies. De plus, l'hydrodiffusion permet une économie d'énergie due à la réduction de la durée de la distillation et donc à la réduction de la consommation de vapeur.

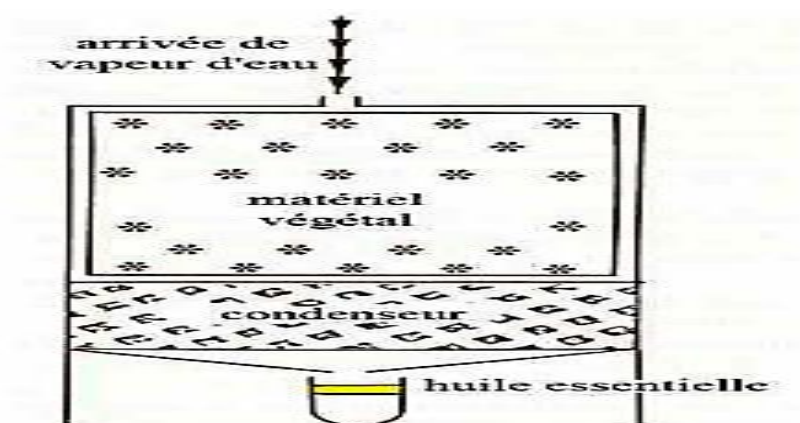


Figure 3 : Montage de l'hydrodiffusion (LUCCHESI, 2005).

5.2. Extraction par CO₂ supercritique

L'originalité de ce procédé d'extraction réside dans le type de solvant employé : le CO₂ (Dioxyde de carbone) supercritique. Au-delà du point critique (Pression= 73,8 bars, T = 31,1°C), le CO₂ possède des propriétés intermédiaires entre celles des liquides et celles des gaz, ce qui lui confère un bon pouvoir d'extraction (CASTIONI *et al.*, 1995).

Un procédé d'extraction par CO₂ supercritique fonctionne en circuit fermé. Il comporte des organes de mise en pression (pompes) et en température (échangeurs) afin d'amener le CO₂ au-dessus de son point critique. Le produit à traiter est placé dans un extracteur traversé par le flux de CO₂ supercritique. Le fluide se charge en composé extrait, puis il est détendu, passe en phase gazeuse et se sépare du composé extrait. Ce dernier est recueilli dans un séparateur. Les molécules solubles dans le CO₂ supercritique, donc extractibles, sont les composés peu polaires de faible masse moléculaire, tels que les composés aromatiques, des alcools, des esters, les stérols (CASTIONI *et al.*, 1995 ; FIDAH, 2016).

5.3. Extraction par solvant

Selon BRIAN (1995), cette technique est rarement utilisée, on l'emploie surtout pour les plantes dont les substances aromatiques risqueraient d'être dégradées par la distillation et lorsque le matériel végétal :

- ne peut être chauffé, par exemple le jasmin (*Jasminum officinale*) ;
- contient une faible concentration de substances aromatiques comme la rose (*Rosa centifolia*) ;
- contient une substance résineuse, comme le benjoin (*Styrax benzoin*).

Les solvants les plus utilisés sous réserve de législations restrictives particulières sont les hydrocarbures aliphatiques : éther de pétrole, hexane, mais aussi propane ou butane liquides (BRUNETON, 1993).

On dissout les principes aromatiques gras, les pigments, les cires, les résines de la plante fraîche dans un solvant volatil dont l'évaporation laisse un résidu cireux très coloré, très aromatique : la concrète. Cette concrète, purifiée par l'alcool absolu, donne l'absolue, qui n'est pas stricto sensu une huile essentielle mais s'en rapproche beaucoup. On appelle

rétinoïde l'homologue de la concrète obtenu à partir de plantes sèche (DURAFFOURD et LAPRAZ, 2002). Cette technique permet d'obtenir une solution homogène d'HE, donc de plus grande quantité que ce que nous obtenons grâce à l'hydrodistillation.

5.4. Expression à froid

Employée uniquement pour les agrumes : le zeste qui contient de petites vésicules d'essence est séparé du fruit puis soumis à l'action d'une presse (DURAFFOURD et LAPRAZ, 2002).

Le procédé classique consiste à exercer, sous un courant d'eau, une action abrasive sur la surface du fruit. Après élimination des déchets solides, l'HE est séparée de la phase aqueuse par centrifugation. D'autres machines rompent les poches par dépression et recueillent directement l'HE, ce qui évite les dégradations liées à l'action de l'eau (BRUNETON, 2009).

5.5. Extraction assistée par micro-onde

La micro-onde agit sur certaines molécules, telles que l'eau, qui absorbent l'onde, et convertissent son énergie en chaleur. Ainsi dans une plante, les ondes sont absorbées par les parties les plus riches en eau (les vacuoles, véritables réservoirs liquides des cellules), puis converties en chaleur. L'extraction par micro-ondes existe sous différentes formes.

5.5.1. Hydrodistillation ou extraction par solvant classique assistée par chauffage micro-onde

L'hydrodistillation ou l'extraction assistée par micro-ondes, a été élaborée et brevetée par la société Archmiex, dans les années 1990. Cette technique d'extraction est basée sur l'utilisation des micro-ondes. Le matériel végétal à traiter frais ou sec (auquel cas on lui rajoute une quantité d'eau ou le solvant) est soumis durant une période un vide pulsé qui permet l'entraînement azéotropique des substances volatiles à une température inférieure à 100°C. L'hydrodistillation assistée par micro-ondes serait dix fois plus rapide que l'hydrodistillation pour un rendement équivalent et un extrait de composition identique (DUVAL, 2012).

5.5.2. Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes (ESSAM)

L'extraction sans solvant assistée par micro-ondes basée sur un principe relativement simple qui consiste à placer le matériel végétal dans un réacteur micro-ondes sans ajout d'eau ou de solvant organique. Le chauffage de l'eau contenue dans la plante permet la rupture des glandes renfermant l'HE. Cette étape libère l'HE qui est ensuite entraînée par la vapeur d'eau produite par la matière végétale. Un système de refroidissement à l'extérieur du four micro-ondes permet la condensation du distillat, composé d'eau et d'huile essentielle, par la suite facilement séparable par simple décantation (LUCCHESI, 2005).

6. Conservation et stockage des huiles essentielles

La relative instabilité des molécules constitutives des huiles essentielles implique des précautions particulières pour leur conservation. En effet, les possibilités de dégradation sont nombreuses, ces dernières, peuvent modifier les propriétés de l'huile essentielle. Ils devraient toujours être conservées dans des flacons de verre marron ou bleu et être entreposées à l'abri de la lumière et du soleil, à environ + 8°C. Dans ces conditions, les huiles d'agrumes et de conifères se conservent en moyenne de un an à un an et demi, tandis que toutes les autres huiles essentielles mûrissent et se bonifient en vieillissant (SHIRNER, 2001 ; BRUNETON, 2009).

7. Toxicités des huiles essentielles

Les HEs 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), ou par contact (exposition à d'importantes concentrations) (DEGRYSE *et al.*, 2008).

Selon JOUAULT (2012), des composants aromatiques de certain HEs peuvent être dangereux et toxique :

- Les molécules allergisantes : limonène, géraniol, eugénol, citronellol ;
- Les molécules stupéfiantes : le trans-anéthol, ou (E)-anéthol ...etc ;
- Les molécules carcinogènes : cis-anéthol , le safrole ...etc ;
- Les molécules irritantes/dermocaustiques : des phénols (thymol, carvacrol, et eugénol) ;

- Les molécules entraînant des interactions avec des médicaments : exemple : eugénol qui possède une activité anti-agrégante plaquettaire. Elle entre donc en interaction avec les médicaments anti-inflammatoires.

Chapitre II :

Description de :

Cedrus atlantica

et

Origanum compactum

1. Présentation de *Cedrus atlantica*

1.1. Noms habituels

- Nom botanique : *Cedrus atlantica*
- Nom local en arabe : arz ; meddad.
- Nom local en berbère : iddil.
- Nom en français : cèdre de l'Atlas, cèdre bleu, cèdre argenté.

1.2. Classification botanique

D'après M'HIRIT et BENZYANE (2006), le cèdre de l'Atlas est classé comme suit :

Règne : plantae

Embranchement : spermaphyta

Sous-embranchement : gymnosperme

Classe : equisetopsida

Sous-classe : pinidae

Ordre : pinales

Famille : pinaceae

Genre : *Cedrus*

Espèce : *atlantica*

Nom binomiale : *Cedrus atlantica*



Figure 4 : Photographie de *Cedrus atlantica* (M'HIRIT et BENZYANE, 2006).

1.3. Description botanique

Le cèdre de l'Atlas est un arbre majestueux au tronc droit, devenant très gros, à la cime d'abord régulière et pointue chez les jeunes sujets, puis très irrégulière et aplatie.

Il possède deux types de rameaux : les uns longs et fins, gris jaunâtre, les autres courts et trapus. L'écorce est lisse et brune puis rompue en écailles gris foncé ou crevassée. Quant aux cônes, elles sont dressés, ovoïdes, déprimés au sommet, lisses, avec des écailles très serrées (ARBEZ, 1997 ; BOULLARD, 2006).

Il est facilement identifiable grâce à l'odeur caractéristique qu'il dégage quand on attaque sa texture ; et se distingue des autres espèces de cèdres par ses rameaux dressés, ses aiguilles courtes, peu pointues.

1.4. Habitat et répartition géographique

Biogéographiquement, le cèdre de l'Atlas est originaire d'Afrique, d'Asie Mineure, de Chypre et de la chaîne de l'Himalaya.

Le Cèdre de l'Atlas (*Cedrus atlantica* Manetti) est une espèce résineuse, concentré surtout au moyen Atlas central, couvre une surface d'environ 131 000 hectares et occupe les étages subhumides à humide froid de 1500 à 2800 mètres. Cependant, elle souffre des attaques des champignons pathogènes, principalement *Trametes pini* et *Ungulina officinalis* qui causent de très graves dégâts en provoquant des pourritures. (ABERCHANE *et al.*, 2003).

1.5. Usage traditionnel

Ce n'est pas un contre sens de rappeler que les anciens égyptiens utilisaient exclusivement du bois de cèdre pour leurs sarcophages : s'il pouvait préserver un cadavre en le rendant imputrescible, il est capable, à fortiori, de soutenir l'énergie vitale d'un corps vivant, bien que malade c'est-à-dire qu'il permet de retrouver l'énergie et vitalité au cours de maladie chroniques (PADRINI et LUCHERONI, 2003).

L'huile de cèdre a une activité antiseptique surtout sur les muqueuses respiratoires, génitales et urinaires, désinfectante, diurétique, fongicide, fortifiante ; stimule l'irrigation sanguine, assure les soins de la peau. Utiliser dans le cas d'acné, de cystite, de douleurs vésicales, de bronchite, elle est très bénéfique pour le traitement de la peau, en cas d'eczéma sec, de prurit, de pellicules, de chute de cheveux, de mycose et d'infection cutanée (SHIRNER, 2001 ; PADRINI et LUCHERONI, 2003).

1.6. Huile essentielle de cèdre

L'HE de *cedrus atlantica* est obtenu par hydrodistillation ou par entraînement à la vapeur du bois ou les aiguilles, mais il faut être vigilant sur la partie utilisée pour l'extraire sous peine de ne pas avoir les effets escomptés. Généralement, c'est le bois

qui nous intéresse, car les aiguilles offrant une huile essentielle proche (au niveau chimique) de celle des autres conifères.

L'HE de bois de cèdre de l'Atlas contient 70 % de sesquiterpènes bicycliques, les α - β -et γ -himachalènes qui sont des précurseurs de molécules aromatiques utilisables en parfumerie (BELAKHDAR, 2001).

2. Présentation de l'*Origanum compactum*

2.1. Noms habituels

- Nom botanique : *Origanum compactum*
- Nom local en arabe : Zatar ; zaâteur (Algérie, Kabylie).
Zaetar, za'tar (Maroc).
- Nom local en berbère : zwi.
- Nom en français : origan ; origans à inflorescence compacte.

2.2. Classification botanique

D'après BOUYAHYA *et al.* (2016)b, l'origan appartient au :

Domaine : biota

Règne : plantae

Embranchement : angiosperme

Classe : magnoliopsida

Sous classe : asteridae

Ordre : lamiales

Famille : lamiaceae

Genre : *Origanum*

Espèce : *compactum*

Nom binomiale : *Origanum compactum*



Figure 5 : Photographie d'*Origanum compactum*
(BOUYAHYA *et al.*, 2016)b.

2.3. Description botanique

Origanum compactum est une plante herbacée vivace. Son odeur est aromatique, et sa saveur amère, un peu âpre et aromatique (CHAFAI *et al.*, 2014).

Les tiges sont toutes dressées, grêles, velues, de longues 20 cm à 1 m ; à feuilles opposées, pétiolées, presque entières, plus ou moins velues sur les bords, de forme ovale et ponctuées de glandes (Il s'agit de minuscules poches à huile essentielle) (AIT YUCEF, 2006).

Les inflorescences sont en épis denses et courtes, très violettes, de grandes fleurs opposées (5-12 mm), sessiles. Dans cet épi, les fleurs sont situées à l'aisselle des feuilles (qui égalent ou dépassent le calice) ; ces fleurs restent contiguës après la floraison (BELKAMEL *et al.*, 2013).

Le calice est habituellement glabre, de 3-4 mm de long, de 5 dents triangulaires subégales (0,5-1 mm). La corolle a une lèvre inférieure émarginée et bien plus longue que la lèvre supérieure, qui elle est trilobée. Elle possède 4 étamines divergentes (AIT YUCEF, 2006).

La principale caractéristique morphologique de cette espèce est la présence d'un organe de secrétariat (trichomes glandulaire et non glandulaire). Cette structure sécrète des huiles essentielles avec une saveur unique, qui est principalement due à ses composés majeurs tels que le carvacrol, le thymol, etc (BOUYAHYA *et al.*, 2016)².

2.4. Habitat et répartition géographique

Biogéographiquement, *O. compactum* pousse spontanément dans les forêts, les substrats calcaires, les arbustes et les pâturages rocheux des plaines et des basses montagnes ; se trouve au Maroc, sud-ouest de l'Espagne et Afrique du Nord (BELKAMEL *et al.*, 2013).

2.5. Usage traditionnel

Les feuilles séchées sont utilisées en tant que médicaments et arômes. La plante séchée et fumée est utilisée comme antiseptique et désinfectant, bonne pour le rhume, les bronchites, les céphalées. L'infusion de la poudre de la plante (les feuilles et les inflorescences) est un excellent remède pour la diarrhée et les troubles intestinaux.

L'HE de cette espèce est en général considéré comme un tonifiant et un bon stimulant mental et sexuel (CHAFAI *et al.*, 2014).

2.6. Huile essentielle d'origan

Origanum compactum contient une HE riche en thymol et carvacrol. Cette essence, contiendrait jusqu'à 67% de phénols totaux, dans lesquels domine le thymol (AIT YUCEF, 2006).

La composition de cette huile expliquerait son action antiseptique, ce qui rendrait la plante utilisable comme antibactérien, antivirale et antifongique (AIT YUCEF, 2006).

Quant aux caractères organoleptiques, l'HE d'origan passe par un large spectre de couleurs passant du jaune pâle au brun voir même noir. L'odeur reste toutefois très piquante, épicée et plus agressive que les autres huiles.

Chapitre III :

Activités biologiques des huiles essentielles et domaines d'utilisation

1. Activités biologiques des huiles essentielles

Le spectre d'action des HEs est très étendu, car elles agissent vis-à-vis d'un large éventail de bactéries, y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques. En outre, certaines essences douées d'une activité antifongique s'opposent au développement des champignons, des moisissures en les détruisant. Ces activités sont par ailleurs variables d'une HE à l'autre et d'une souche à l'autre (OUIS, 2015).

1.1. Activité antimicrobienne

Lorsque l'on parle d'activité antimicrobienne, on distingue deux sortes d'effets : une activité létale ou bactéricide, et une inhibition de la croissance ou activité bactériostatique. Le plus souvent l'action des HEs est assimilée à un effet bactériostatique (ZHIRI, 2006).

1.1.1. Activité antibactérienne

Plusieurs travaux scientifiques ont montré que les HEs ont un effet inhibiteur sur la croissance et la toxigenèse de plusieurs bactéries.

L'examen des données bibliographiques fait apparaître d'emblée la diversité des recherches placée pour mettre en évidence l'activité antibactérienne des HEs.

Ces différents travaux sont répertoriés et décrites dans des livres (BRUNETON, 1993 ; AIT YUCEF, 2006), des thèses de doctorat (PIERRON, 2014 ; KOZIOL, 2015 ; OUIS, 2015) ainsi que dans différentes publications (AMARTI *et al.*, 2010 ; BENCHEQROUN *et al.*, 2012 ; BESSAH *et al.*, 2015 ; BOUYAHYA *et al.*, 2016 ; CHEBAIBI *et al.*, 2016).

À titre d'exemple, une étude a investigué l'activité de 52 HEs et extraits de plantes sur un large éventail de bactéries à Gram positif et Gram négatif ainsi que sur des levures. Les résultats ont été positifs et ont mis en évidence, pour la plupart d'entre elles, un pouvoir inhibiteur. En particulier, les HEs de lemongrass, d'origan et de laurier ont exercé un effet inhibiteur sur tous les organismes (ZHIRI, 2006).

Les HEs agissent aussi bien sur les bactéries à Gram positif que sur les bactéries à Gram négatif. Toutefois, les bactéries à Gram négatif paraissent moins sensibles à leur action et ceci est directement lié à la structure de leur membrane externe qui contient des lipopolysaccharides qui créent une barrière contre les macromolécules et les composés hydrophobes (WALSH *et al.*, 2003) sauf quelques exceptions, comme par exemple *Aeromonas hydrophila* et *Campylobacter jejuni* qui ont été décrites comme particulièrement sensibles à l'action des HEs. Néanmoins *Pseudomonas aeruginosa*, bactérie à Gram négatif, reste la moins active vis-à-vis des essences végétales (BURT, 2004).

Dans la bibliographie scientifique, il n'y a pas un grand nombre d'auteurs ayant rapporté le mécanisme d'action des HEs et leurs composants, et jusqu'à maintenant ils n'ont pas totalement compris le mécanisme. Mais quelques auteurs ont donné plusieurs suppositions selon leurs observations. Du fait de la variabilité quantitative et qualitative des composants des HEs, il est probable que leur activité antimicrobienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire (OUIS, 2015).

L'activité biologique d'une HE est liée à sa composition chimique, aux groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) et à leurs effets synergiques (ZHIRI, 2006). Le carvacrol est un mono terpène qui traverse la membrane cytoplasmique, diminue le potentiel membranaire par la fuite du potassium intracellulaire tel qu'il est illustré dans la figure n°6. La membrane devient ainsi perméable aux protons. Cette dissipation de gradient d'ions à travers la membrane cytoplasmique conduit à une altération du potentiel transmembranaire (ULTEE *et al.*, 2002).

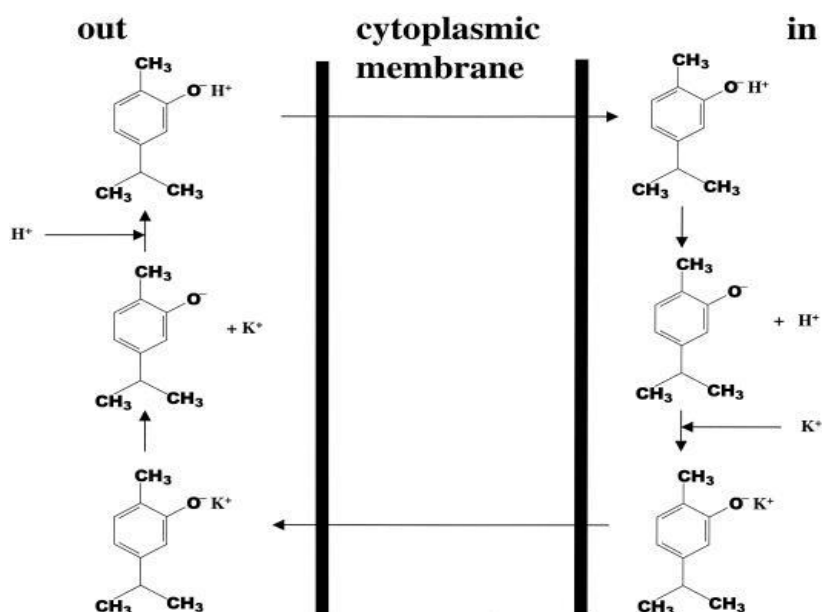


Figure 6 : Mécanisme d'action du carvacrol sur la membrane cytoplasmique bactérienne (ULTEE *et al.*, 2002).

Plusieurs études ont ainsi montré l'apparition de fuites d'ions potassium dans des cellules microbiennes (*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*) en contact avec de l'HE d'arbre à thé (tea tree). Cette fuite de potassium est la toute première preuve de l'existence de lésions irréversibles au niveau de la membrane de la bactérie. Le thymol, le carvacrol, des composants actifs d'HEs, rendent perméable la membrane des bactéries, un effet précurseur de leur mort. Les HEs ont donc bien des propriétés bactéricides (ZHIRI, 2006).

1.1.2. Activité antifongique

FREEMAN et CAREL (2006), ont signalé que les groupes moléculaires avec les plus puissantes actions antibactériennes sont également des antifongiques efficaces, mais ils doivent être utilisés sur de plus longues périodes. Expérimentalement, les HEs des plantes aromatiques et médicinales ont fait preuve de leur efficacité antifongique parfois même supérieure à celle des agents antifongiques commerciaux.

L'activité antifongique des HEs des plantes aromatiques a été confirmée par de nombreux auteurs :

RUSSO *et al.* (2013), ont testés l'activité de l'HE de *Thymus capitatus* contre le champignon du sol *Sclerotium cepivorum* Berk. isolé à partir de sclérotés produites sur l'oignon rouge présentant des symptômes de pourriture blanche. L'activité antifongique / fongitoxique de l'HE de *T. capitatus* sur *S.cepivorum* a été évaluée *in vitro* en mesurant la croissance mycélienne. Après deux semaines sur plaque de croissance, il était possible de voir que la réduction maximale était déjà obtenue à la concentration d'HE de *T. capitatus* de 200 ppm (partie par million) où aucun mycélium ne se développait. À baisser la concentration en HE la croissance mycélienne est plus grand.

L'action fongicide des HEs des clous de girofle et d'origan a été testée sur un modèle de levure *Saccharomyces cerevisiae*. La lyse des cellules de levure a été montrée par la libération de substances absorbante à 260 nm. Des analyses au microscope électronique ont montré que la surface des cellules traitées par les HEs d'origan et de clous de girofle était significativement endommagée (CHAMI, 2005).

Selon SALHI (2015), la méthode de contact directe nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antifongique de l'HE du *Laurus nobilis* vis-à-vis de la souche *Fusarium sporotrichioides*. L'activité antifongique de l'HE du *Laurus nobilis* L. s'est avéré un agent antifongique efficace contre le *Fusarium sporotrichioides* à une dose de 0,5% de l'HE de *Laurus nobilis*. L'activité antifongique croît au fur et à mesure quand la concentration en HE augmente, cela est induit à la régression de vitesse de la croissance mycélienne qu'ils sont appariât sous microscope avec des déchirures de petits diamètres, avec des couleurs différents. Cette étude permet encore une fois la mise en valeur de l'exploitation des HEs dans d'autres domaines, pharmaceutiques et cosmétiques. Par la même occasion, elle confirme leur utilisation comme conservateur dans le domaine de l'industrie agroalimentaire.

1.1.3. Activité Antivirale

Les virus sont en général très sensibles aux molécules aromatiques. Les réponses classiques aux infections virales étant très limitées, les HEs constituent une véritable alternative pour traiter les troubles d'origine virales allant des plus banales aux plus redoutables (PIERRON, 2014). De nombreuses familles de molécules chimiques rencontrées dans les extraits végétaux ont montré *in vivo* une activité antivirale et, parmi elles, les monoterpénols et les monoterpénals (FREEMAN et CAREL, 2006).

À titre d'exemple, l'HE d'*Eucalyptus globulus* possède une activité antivirale. Elle est notamment importante concernant Herpes Simplex Virus (HSV). Le HSV existe sous deux formes : le HSV-1 qui est plus souvent responsable de l'herpès labial et le HSV-2 qui est plus souvent responsable de l'herpès génital. Une fois contaminé par le virus HSV, on ne peut pas en guérir totalement. Le virus reste à l'état latent dans l'organisme et peut se réactiver à tout moment à la suite d'un élément déclencheur (stress, fièvre, menstruations, fatigue...etc). C'est lors de cette phase de réactivation que l'on peut traiter les symptômes. Des études ont ainsi démontré que les HEs d'*Eucalyptus globulus* et de *Tea tree* possèdent une forte activité antivirale contre HSV. On pourra donc les utiliser afin de traiter un bouton de fièvre, appliquées sur le bouton soit pures, soit en mettant 1 goutte d'HE dans une pommade d'aciclovir et ce, cinq fois par jour minimum (vitesse de réplication du virus) (KOZIOL, 2015).

1.2. Activité anti-tumorale

Ces dernières années, la thérapie anticancéreuse a connu un réel bouleversement et un foisonnement de découvertes fondamentales. Plusieurs études accumulatives ont révélé l'activité antitumorale des substances naturelles isolées à partir de plantes. Les HEs et leurs constituants ont montré des activités anticancéreuses puissantes *in vitro* et *in vivo*. Cependant, les mécanismes d'action sont encore peu étudiés et moins connus. Par ailleurs, leur application dans l'industrie pharmaceutique nécessite une spécificité-sélectivité pharmacodynamique absolue (BOUYAHYA *et al.*, 2016)b.

L'HE isolée des graines de *Nigella sativa* L., démontre une activité cytotoxique *in vitro* contre différents lignées tumorales. *In vivo*, elle limite la prolifération des métastases hépatiques et retarde la mort des souris ayant développé la tumeur P815

(MBAREK *et al.*, 2007). L'HE de *Melissa officinalis* s'est quant à elle, révélée efficace contre des cellules de lignées cancéreuses humaines, incluant des cellules leucémiques HL-60 et K562 (DE SOUSA *et al.*, 2004).

1.3. 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 moléculaire 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).

L'utilisation des molécules antioxydantes de synthèse étant actuellement remise en cause en raison des risques toxicologiques potentiels. Ainsi, de nouvelles sources végétales d'antioxydants naturels (carvacrol, eugénol, tocophérol, thymol...) sont recherchées par les industriels (BELHADJ *et al.*, 2010).

DJENANE *et al.* (2002), ont rapporté que les viandes traitées avec des antioxydants naturels d'origine végétale, emballées sous atmosphère modifiée (en présence de O₂, CO₂, N₂) et postérieurement exposées dans des vitrines frigorifiques illuminées par des tubes fluorescents standards ont montré une stabilité chimique et microbiologique durant une longue période d'exposition par rapport aux viandes non traitées.

1.4. Activité anti-inflammatoire

En 1918, René-Maurice Gattefossé, chimiste et parfumeur, se brûle la main lors d'une explosion dans son laboratoire. Par réflexe, il plonge sa main dans un récipient rempli d'HE de lavande vraie. Le soulagement est immédiat, la guérison de la plaie et sa cicatrisation d'une rapidité déconcertante (ZHIRI, 2006).

Les HEs cicatrisantes sont les HEs de ciste (*Cistus ladaniferus*), de lavande vraie (*Lavandula vera*), d'immortelle (*Helichrysum italicum*), de myrrhe (*Commiphora myrrha*). Leur propriété cicatrisante s'explique par la présence de cétones capables d'accélérer la vitesse de réparation tissulaire. On utilise souvent un mélange de plusieurs huiles

essentielles cicatrisantes avec une huile végétale comme l'huile d'amande douce (PIERRON, 2014).

2. Domaines d'utilisation des huiles essentielles

En raison de leurs diverses propriétés, les HEs sont devenues une matière d'importance économique considérable avec un marché en constante croissance. En effet, elles sont commercialisées et présentent un grand intérêt dans divers secteurs industriels comme en pharmacie par leurs pouvoirs antiseptique, analgésique, antispasmodique, apéritif, antidiabétique...etc, en alimentation par leur activité anti-oxydante et leur effet aromatisant, en parfumerie et en cosmétique par leur propriété odoriférante (OUIS, 2015).

2.1. Aromathérapie

L'aromathérapie est une forme de médecine alternative dans laquelle les HEs ont une grande importance car elles induisent de nombreux effets curatifs. Ainsi elles s'utilisent de plus en plus dans diverses spécialités médicales telles que : la podologie, l'ostéopathie, la rhumatologie ainsi que dans l'esthétique (BRUNETON, 1993).

2.2. Cosmétologie et parfumerie

L'industrie des cosmétiques, savonneries et parfums constitue le plus gros consommateur d'HE. Il représente 60 % de la demande totale en substances naturelles en particulier celles de rose, de jasmin, de violette, de verveine,... etc. Les HEs sont utilisées comme matière première de base pour parfumer les produits cosmétiques : les dentifrices, les shampoings, les crèmes solaires, les rouges à lèvres, les savons,...etc (BESSAH, 2015 ; OUIS, 2015).

À titre d'exemple, l'essence de vétiver, grâce à son odeur agréable, est recherchée en cosmétologie et en parfumerie haut de gamme associée à d'autres essences telles que le santal, le patchouli ou la rose pour lesquelles elle joue le rôle de fixateur naturel (OUIS, 2015).

2.3. Industrie Pharmaceutique

Les essences issues des plantes sont utilisées en grande partie dans la préparation d'infusion (menthe, verveine, thym,...etc) et sous la forme de préparations galéniques. Plus de 40% de médicaments sont à base de composants actifs de plantes, par exemple gastralgine est un digestif anti-acide qui se compose d'HE de carvie. De même, elles permettent par leurs propriétés aromatisantes de masquer l'odeur désagréable de médicaments absorbés par voie orale. Aussi beaucoup de médicaments vendus en pharmacie sont à base d'HEs comme par exemple les collyres, les crèmes,...etc (BRUNETON, 1993 ; OUIS, 2015).

2.4. Industrie agro-alimentaire

En industrie alimentaire, on cherche toujours à avoir une conservation saine et de longue durée pour les produits consommés ainsi qu'une qualité organoleptique meilleure ; par exemple conservation du Smen par le thym et le romarin.

Plusieurs travaux ont montré que les huiles essentielles de thym, d'origan, de cannelle et d'autres plantes aromatiques ont un effet inhibiteur sur la croissance et la toxinogénèse de plusieurs bactéries et champignons responsables de toxi-infections alimentaires (OUIS, 2015).

2^e partie :

Étude
expérimentale

Matériel et méthodes

La partie expérimentale a été effectuée au Laboratoire Pédagogique Commun de Microbiologie, Université Mouloud MAMMERI de Tizi-Ouzou, Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques, département de Biochimie-Microbiologie, pendant la période allant de février 2018 à juin 2018.

Au cours de cette étude nous nous sommes intéressées aux effets bénéfiques que l'on peut retrouver en exploitant des composés naturels. Nous avons évalué les effets biologiques des huiles essentielles de deux plantes médicinales : *Origanum compactum* (origan) et *Cedrus atlantica* (cèdre).

Les effets biologiques ciblés dans cette étude sont : activité antibactériennes et antifongique.

1. Matériel

1.1. Huiles essentielles testées

Les deux HEs qui ont été testées durant notre partie expérimentale nous ont été aimablement fourni par M^r. OUELHADJ. Elles sont 100% pures et d'origine naturelle (c'est-à-dire non coupées avec d'autre huiles, non dénaturées par d'autre composants et non modifiées après extraction), issu de l'agriculture biologique, obtenu par hydrodistillation et l'organe de ces plantes utilisée pour extraire les huiles est les parties aériennes. Ces deux huiles essentielles sont de provenance de Laboratoire Pierre, Fabre, France, Certifié par ECOCERT.

Les flacons renfermant ces huiles sont opaques et bien fermés. Ils sont conservés à l'abri de la lumière et de l'oxygène à une température de réfrigération de 4°C.

1.2. Souches microbiennes testées

L'activité antibactérienne et antifongique des deux HEs a été testée sur des souches de références appartenant à l'American Type Culture Collection (ATCC), ainsi que sur des souches cliniques. Elles ont été sélectionnées en fonction de leur pouvoir pathogène et leur résistance naturelle aux antibiotiques. L'ensemble de ces souches sont sommairement décrites dans le tableau I.

Les souches bactériennes et fongiques ont été aimablement fournies par le Laboratoire Pédagogique Commun de Microbiologie, Université Mouloud MAMMERI de Tizi-Ouzou. Elles sont régulièrement entretenues par repiquage sur un milieu nutritif.

Tableau I : Tableau descriptif des différentes souches utilisées pour le test de l'activité antimicrobienne des deux huiles essentielles.

Microorganismes testées		GRAM
Bactéries de références	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Négatif
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	Positif
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Positif
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Négatif
Bactéries cliniques	<i>Escherichia coli</i> Prélèvement urinaire	Négatif
	<i>Staphylococcus aureus</i> Prélèvement urinaire	Positif
Champignon	<i>Aspergillus niger</i>	/
Levure	<i>Candida albicans</i>	

1.3. 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 II : Tableau descriptif des milieux de cultures utilisés.

Milieux de culture	Utilisation
Gélose de Muller Hinton (MH)	Étude de la sensibilité des bactéries aux agents antimicrobiens
Gélose nutritive	Repiquage des colonies (culture et isolation de colonies non exigeantes)
Bouillon : Brain Heart Infusion Broth (BHIB)	Revivification et enrichissement des souches bactériennes utilisées
Gélose Chapman	Culture de <i>Staphylococcus aureus</i>
Gélose Hecktöen	Culture des bactéries Gram négatifs : <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 et <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
Gélose Sabouraud	Culture des levures et champignons
Gélose PDA : Potato Dextrose Agar Gélose dextrose à la pomme de terre	Culture des champignons

1.4. Antibiotiques et antifongique utilisés

L'ensemble des antibiotiques ainsi que l'antifongique utilisés sont cités dans le tableau IV.

Tableau III : Antibiotiques et antifongique utilisés et leurs valeurs des diamètres des zones d'inhibitions (CASFM, 2012).

CASFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

	Nom	Abréviation	Quantité par disque	Famille	Diamètre critique (mm)	
					Sensible	Résistante
Antibiotiques	Sulfaméthoxazole / Triméthoprim	SXT	25 µg	Sulfamide-Triméthoprim	≥ 16	< 10
	Céfoxitine	FOX	30 µg	Bêta-lactamine	≥ 22	< 15
	Céfotaxime	CTX	30 µg	Bêta-lactamine	≥ 26	< 23
	Kanamycine	K	30 µg	Aminoside	≥ 17	< 15
	Céfalexine	CN	10 µg	Bêta-lactamine	≥ 18	< 12
	Oxacilline	OX	5 µg	Pénicilline	≥ 20	< 20
	Amoxicilline	AX	25 µg	Bêta-lactamine	≥ 23	< 16
Antifongique	Amphotéricine B Fungizone®	/	/	Antifongique	/	/

1.5. Émulsifiant utilisé

Généralement, les HEs sont peu solubles dans l'eau, et cela provoque de nombreux problèmes pour l'étude de leur effet biologique. Afin de surmonter ce problème, de nombreux auteurs ont recommandé l'utilisation de divers solvants dans la dilution des HEs telles que l'acétone, le méthanol et le DMSO (LAHLOU, 2004).

L'émulsifiant utilisé dans notre étude est le DimethylSulfoxide (DMSO), qui est un solvant organique polaire, miscible à l'eau et utilisé pour la dilution des HEs testées et pour avoir une meilleure diffusion des huiles dans le milieu. Le DMSO est inerte sur l'activité antimicrobienne (LAHLOU, 2004).

1.6. Appareillage

Tableau IV : Appareils utilisés.

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

2. Méthodes

2.1. Tests de revivification microbiologique des souches microbiennes

Les souches bactériennes testées ont été revivifiées dans le milieu de culture : 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.

Les souches fongiques testées ont été revivifiées dans le milieu de culture Sabouraud par repiquage qui a été effectué à partir des milieux de conservation des souches :

- *Candida albicans* : par la technique des stries des trois quadrants.
- *Aspergillus niger* : par dépôt des spores sur le milieu de culture Sabouraud.

Les boîtes sont ensuite incubées à 30°C pendant 72h.

2.2. Tests de confirmation microbiologiques de la pureté des souches microbiennes

2.2.1. Repiquage sur les milieux sélectifs

Les souches bactériennes testées ont été repiquées à partir des cultures contenues dans le BHIB sur les milieux sélectifs, suivies d'une incubation à 37°C pendant 24h.

2.2.2. Examens microscopiques

Pour les souches bactériennes, la coloration différentielle 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 on passant la lame directement 3 fois dans la flamme du bec Bunsen ;

- Coloration au violet de Gentiane (colorant basique) ou cristal violet et laisser agir pendant 30 secondes à 1 minute (toutes les bactéries sont colorées en violet) puis rincer à l'eau ;
- Mordantage au Lugol : 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 : 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 l'huile d'immersion).

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

Pour les souches fongiques, une identification visuelle (caractères macroscopiques) est effectuée sur le milieu Sabouraud suivi d'un examen microscopique, donc on observe principalement :

- Les caractères macroscopique : pour déterminer les caractères morphologiques d'*Aspergillus niger*, on a réalisé un examen visuel sur le milieu 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 a effectué un 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 observer sous microscope.

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.

2.3. Étude de l'activité antibactérienne des deux huiles essentielles

2.3.1. Pré-enrichissement des souches bactériennes

Pour chacune des souches un pré-enrichissement a été effectué sur un milieu d'isolement sélectif à partir des tubes de BHIB contenant les souches revivifiées.

L'ensemencement se fait par la méthode des trois cadrans afin d'obtenir des colonies bien isolées qui serviront à la standardisation de l'inoculum. Les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C pendant 18h préférentiellement et au plus tard 24h afin de disposer de colonies jeunes en phase de croissance exponentielle.

2.3.2. Préparation des suspensions bactériennes

À partir des boîtes de Pétri ensemencées précédemment et à l'aide d'une anse de platine, quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques sont raclées et mises dans un volume d'eau physiologique stérile à 0,9% de chlorure de sodium (NaCl). La suspension bactérienne est bien homogénéisée, ensuite une standardisation de la suspension est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde de 625 nm et la densité optique est ajustée à : 0,08 à 0,10.

On admet que cette densité mesurée à 625 nm est équivalente à 10^8 UFC/ml (HADDOUCHI *et al.*, 2016). L'inoculum est ajusté en fonction de la charge ; soit en ajoutant de la culture si la DO est faible ou de l'eau physiologique stérile s'il est trop chargé. L'ensemencement doit se faire en moins de 30 min après la préparation de l'inoculum.

2.3.3. Évaluation de l'activité antibactérienne *in vitro* des deux huiles essentielles

L'évaluation de l'activité antibactérienne des deux HEs testées a été réalisée par la méthode de diffusion sur gélose appelée aromatoگرامme ou encore méthode des disques. Bien qu'elle soit reconnue comme fiable et reproductible, elle constitue surtout une étape préliminaire à des études plus approfondies, car elle permet d'accéder à des résultats essentiellement qualitatifs (DIMA, 2016).

Elle permet de mettre en évidence l'effet antimicrobien de l'HE et de déduire la résistance ou la sensibilité des souches microbiennes (AMARA *et al.*, 2017).

Cette méthode à l'avantage d'une grande souplesse dans le choix des huiles essentielles testées, et de s'appliquer à un très grand nombre d'espèces bactériennes et d'avoir été largement évaluée durant 50 ans d'utilisation (KHEYAR *et al.*, 2014).

Le protocole suivi est celui décrit par HADDOUCHI *et al.*(2016), qui est réalisée comme suit :

- À l'aide d'une micropipette, 100 µl de chaque suspension bactérienne standardisée est ensemencé uniformément dans des boîtes de Pétri contenant le milieu de culture gélosé Mueller Hinton ;
- Imprégné un disque stérile de papier Whatman (6mm de diamètre) avec 10 µl d'une préparation d'HE additionnée de DMSO à raison de 5% (V/V) ;
- Laisser le disque sécher pendant quelques instant (pas trop longtemps pour éviter l'évaporation de l'HE) ; puis le déposer 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 l'étuve à la température 37°C pendant 24h.

Afin de valider les résultats, des boîtes de contrôle sont réalisées :

- Témoin négatif : par dépôt de disques de papier Whatman imprégnés de 10 µl de DMSO au milieu des boîtes préalablement ensemencées avec une suspension bactérienne standardisée ;
- Témoin positif : par dépôt des disques d'antibiotiques dans des boîtes préalablement ensemencées avec une suspension bactérienne standardisée.

Les deux HEs ont été testé en duplicat pour chaque espèce bactérienne.

La lecture des résultats s'est faite 24 heures après l'incubation par la mesure des diamètres des zones d'inhibition (En mesurant la moyenne des deux diamètres perpendiculaires passant par le milieu du disque), qui sont ainsi déterminé comme un halo translucide autour du disque à l'aide d'une règle en (mm).

Suivant le diamètre de la zone d'inhibition exprimé en (mm) autour de chaque disque, la lecture des résultats est faite comme suit (DJABOU *et al.*, 2013) :

- Résistante (-) : diamètre $\leq$ 8mm.
- Modérément sensible (+) : diamètre compris entre 8 et 14mm.
- Sensible (++) : diamètre compris entre 14 et 20mm.
- Extrêmement sensible (+++) : diamètre $>$ 20 mm.

2.3.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'huile d'origan

Même si les HEs sont considérées comme des additifs salubres, leur utilisation est souvent limitée par les critères organoleptiques de l'aliment. Pour cette raison, il sera nécessaire de déterminer la CMI car selon l'effet recherché et les bactéries ciblées la concentration ne sera pas la même (LAMBERT *et al.*, 2001).

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'huile essentielle inhibant toute croissance visible à l'œil nu après 16 à 20 heures d'incubation à 37°C. Les micro-organismes restent cependant viables (MAHFOUF *et al.*, 2017).

La méthode de macro-dilution en bouillon BHIB a été utilisée pour déterminer la CMI. Du fait du non miscibilité des HEs à l'eau et donc au milieu de culture, la mise en émulsion a été réalisée grâce au DMSO (5% V/V) afin de favoriser le contact germe/huile. Cette technique était parmi les premières à être développée et sert toujours de méthode de référence, elle consiste à inoculer par un inoculum standardisé, une gamme de concentration décroissante en HE (DAS *et al.*, 2010).

450 μ l de l'HE à tester additionnée du DMSO (5% V/V) est placé dans un tube stérile contenant 3,55 ml du milieu BHIB. Ce tube correspond à la solution mère à partir de laquelle une dilution en cascade de demi en demi est effectuée dans du milieu BHIB, de manière à obtenir une gamme de concentration comprise entre 63,38 μ l/ml et 0,12 μ l/ml de l'huile (tableau V).

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

Tubes	Solution mère	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Rapport de dilution de l'HE	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024
%	100	50	25	12,50	6,25	3,12	1,50	0,78	0,40	0,20	0,10
HE μ l /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 μ l d'un inoculum bactérien standardisé à 10^8 UFC/ml dans chacun des tubes de la gamme de dilution ainsi que le tube contenant la solution mère. Un témoin négatif de la croissance bactérienne est réalisé par ajout de 10,5 μ l de la suspension bactérienne standardisée dans un tube contenant 2ml de BHIB supplémenté en DMSO (5% V/V). Un tube témoin contenant 2ml de BHIB non ensemencé est réalisé afin de comparer nos résultats (absence de trouble).

L'ensemble des tubes inoculés est incubé à la température optimale de la croissance du germe pendant 24h à 37°C. Après incubation, l'observation de la gamme permet d'accéder à la CMI de l'HE qui est le dernier tube dépourvu de croissance bactérienne.

2.3. 5. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) de l'huile d'origan

Le test de la CMB succède directement au test de la CMI. En fait, la même gamme de concentration réalisée pour la technique de dilution par la CMI est utilisée pour déterminer la CMB de l'huile essentielle à tester.

La méthode consiste à prélever 100 μ l des cultures de BHIB n'ayant pas donné de développement bactérien (Absence de trouble, résultat du test de la CMI) sur un milieu de culture MH.

Afin de valider les résultats, des boîtes de contrôle sont réalisées :

- Témoin négatif : par dépôt de 100 μ l des cultures de BHIB ayant donné de développement bactérien (présence de trouble).

- Témoin positif : par dépôt de 100 µl des cultures de BHIB qui a servi de témoin positif de la CMI.

Puis, les géloses ensemencées sont incubées à 37 °C pendant 24h. Après incubation, la CMI est considérée comme étant la concentration minimale en HE pour laquelle aucun développement bactérien n'est observé.

L'effet antibactérien a été jugé bactériostatique ou bactéricide en fonction de la présence ou absence de colonies bactériennes.

2.3.6. Étude de l'effet de la combinaison des deux huiles essentielles

2.3.6.1. Test de sensibilité des trois souches bactériennes vis-à-vis de la combinaison des deux huiles essentielles avec une proportion de : 50% de l'HE d'origan compact + 50% de l'HE de cèdre d'Atlas

Cette combinaison est réalisée afin de tester l'activité antimicrobienne et de voir s'il y a une éventuelle synergie entre nos deux huiles combinées sur trois souches qui sont pour l'une du genre *B. cereus* ATCC 10876 et l'autre *S. aureus* ATCC 25923 ainsi que *E. coli* ATCC 25922 car c'est elles qui se sont avérées les plus sensibles à l'HE d'origan.

Ce test consiste à mélanger à proportions égales nos deux huiles, donc 50% de l'huile essentielle d'origan et 50% de l'huile essentielle de cèdre, additionnées de DMSO à raison de 5% (V/V), ensuite le mélange est testé par la technique d'aromatogramme. Les boîtes sont alors incubées à l'étuve à 37°C pendant 24h et le lendemain on mesure les diamètres des zones d'inhibition.

2.3.6.2. Test de sensibilité des trois souches bactériennes vis-à-vis de la combinaison des deux huiles avec une proportion de : 75% de l'HE d'origan compact + 25% de l'HE du cèdre

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 HEs utilisées ne sont pas égales.

Pour cela 75% de l'HE d'origan et 25% de l'HE de cèdre additionnées de 5%(V/V) de DMSO sont mélangés et tester sur les mêmes souches citées précédemment.

Le protocole adopté est le même que celui décrit précédemment.

2.3.6.3. Test de sensibilité de trois souches bactériennes vis-à-vis de la combinaison des deux huiles avec une proportion de : 25% de l'HE d'origan compact + 75% de l'HE du cèdre

Le protocole adopté est le même que celui décrit précédemment.

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

L'activité antifongique des deux HEs a été évaluée *in vitro* sur deux espèces fongiques qui sont : *Aspergillus niger* (Moisissure) et *Candida albicans* (Levure).

2.4.1. Préparation des suspensions fongiques

Candida albicans : pour ce faire, on a suivi le même protocole décrit pour la préparation de suspension bactérienne.

Aspergillus niger : À partir d'une culture pure fraîchement préparée, des spores ont été prélevées puis déchargées dans de l'eau physiologique saline (0,9%). La suspension fongique doit être bien homogène, on procède alors à une observation microscopique afin de réaliser un comptage des spores sur la cellule de Malassez au grossissement G x 400 dans le but de standardiser la suspension des spores à 10^7 spores/ml.

Ensuite, on a prélevé 200 µl de cette dernière à l'aide d'une micropipette, qu'on a étalé sur le milieu PDA avec un râteau, les boîtes sont alors incubées à 30°C pendant 72h.

2.4.2. Évaluation de l'activité antifongique des deux huiles essentielles *in vitro*

2.4.2.1. Activité anti- *Candida* des deux huiles essentielles

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

Pour le témoin positif on imbibe un disque Whatman avec 10 µl de l'Amphotéricine B, quant au témoin négatif on imbibe le disque avec 10 µl de DMSO.

La lecture des résultats se fait après incubation à 30°C pendant 72h en mesurant les diamètres des zones d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'une règle.

2.4.2.2. Activité anti- *Aspergillus* des deux huiles essentielles

Pour l'évaluation de l'activité anti-*Aspergillus*, nous avons opté pour la méthode de contact direct décrite par SINGH *et al.*(2008), où les diamètres des zones de croissance du mycélium sont mesurés.

Les HEs d'*O. compactum* et *C. atlantica* ont été testées avec des concentrations de 0,33 ; 0,66 ; 1,00 et 2,00 µl/ml. Ces concentrations en HEs ont été obtenues par addition de 5 ; 10 ; 15 et 30 µl pour chaque huile respectivement dans 15 ml de milieu PDA en surfusion dans un erlenmeyer gradué qui a été ensuite agité pour assurer une bonne dispersion de l'huile dans le milieu de culture. Les boîtes de Pétri ainsi coulées ont été laissées sur la paillasse jusqu'à solidification.

L'inoculation a été effectuée par le dépôt au centre de la boîte d'un disque mycélien d'environ 9 mm de diamètre d'une pré-culture de 3 jours.

Une boîte de Pétri contenant 15 ml du milieu PDA sans HE, inoculée d'un disque de mycélium a servi de témoin négatif.

Une 2^e boîte de Pétri contenant 15 ml du milieu PDA avec 10 µl de l'amphotéricine B, inoculée d'un disque de mycélium a servi de témoin positif.

Les boîtes ont été incubées à 30°C pendant 9 jours ou les diamètres de croissance mycélienne sont mesurés au 3^e, 5^e, 9^e jours et comparés à celui du témoin négatif.

2.4.3. Évaluation de l'activité anti-*Aspergillus* de l'huile d'origan compact *in vivo*

2.4.3.1. Matrice alimentaire utilisée

Concernant l'évaluation de l'activité antifongique de l'HE d'origan dans une matrice alimentaire, nous avons opté pour un fruit, type pomme jaune, produite localement (Tizi-ouzou, Algérie).

2.4.3.2. Préparation des pommes

Après lavage des fruits de pommes avec l'eau javellisée diluée à 10% et rinçage trois fois avec de l'eau distillée stérilisée, les fruits bien égouttés sont incisés à l'aide d'un couteau puis ensemencés en trois piqures centrales sur le lieu d'incision avec la souche fongique d'*Aspergillus niger* standardisé à 10^7 spores/ml.

Neuf fruits inoculés de suspension fongique ont été divisés en trois groupes pour l'expérience, où chaque groupe de trois pommes est placé dans une boîte en plastique fermé mais perforé afin d'assurer l'oxygénation de la souche :

- 1^{er} groupe : méthode de contact direct : les pommes ont été inondées d'huile essentielle d'origan à la surface ;
- 2^e groupe : méthode de micro-atmosphère : les pommes inoculés sont placés dans la boîte où il y a 6 disques de papier Watman d'environ 24 mm de diamètre, imbibés par 100 µl de l'HE d'origan pour chacun. Cette technique permet d'étudier l'effet de la phase volatile des huiles essentielles sur le champignon.
- 3^e groupe : Des témoins sont aussi préparés et inoculés par la souche fongique mais sans addition d'huile essentielle.

Chaque groupe a été réalisé en duplicata.

L'ensemble des boîtes est laissé à température ambiante pendant vingt et un (21) jours.

Résultats et discussion

1. Résultats des tests de vérification des souches bactériennes

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

Tableau VI : Caractères morphologiques des souches bactériennes testées.

Souches bactériennes		Milieu de culture	Gram	Aspect microscopique
Souches de références	<i>E. coli</i> ATCC 25922	Gélose Hecktöen	Négatif	Coccobacilles
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Gélose Chapman	Positif	Cocci en grappe de raisin
	<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	Gélose Hecktöen	Négatif	Bacilles
	<i>B. cereus</i> ATCC 10876	Gélose nutritive	Positif	Bacilles
Souches cliniques	<i>S.aureus</i>	Gélose Chapman	Positif	Cocci en grappe de raisin
	<i>E. coli</i>	Gélose Hecktöen	Négatif	Coccobacilles

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

La confirmation de la pureté de la souche fongique d'*Aspergillus niger* consiste en l'observation des caractères macroscopiques de la souche cultivée sur milieu Sabouraud, qui se résument en l'aspect du mycélium de la souche, la surface et consistance des colonies ainsi que le revers de la boîte. Ensuite l'observation microscopique de la souche fongique, qui prend en compte la forme du thalle et des spores. Les résultats des études macroscopiques et microscopiques sont mentionnés dans le tableau VII.

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

<i>Aspergillus niger</i>	
Caractères macroscopiques	Caractères microscopiques
- 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.	Thalle à mycélium cloisonné portant des têtes aspergillaires (spécificité du genre <i>aspergillus</i>) qui sont des vésicules à l'extrémité des conidiophores qui donnent naissance à des spores externes allongées (stigmates ou phialides) qui à leur tour donnent des conidies.

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

2.1. Résultats des témoins négatifs réalisés avec le DMSO

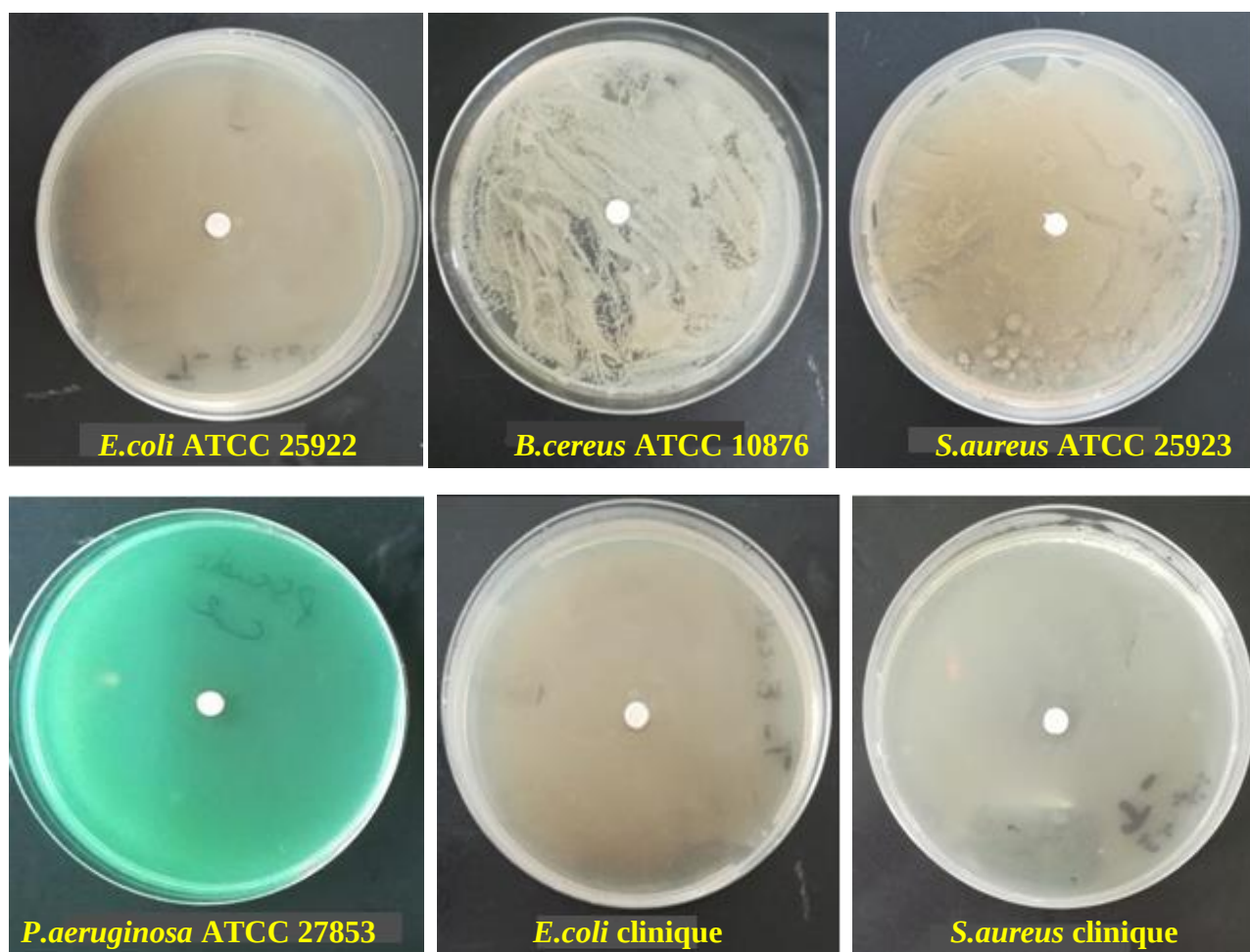


Figure 7 : Photographies des témoins négatifs des souches de références et cliniques testées pour l'activité antibactérienne des deux HEs.

Le DMSO (à raison 5%) n'a pas d'effet antimicrobien sur les souches testées aux concentrations utilisées dans cette étude comme le montre la figure 7, donc ce dernier est bien inerte vis-à-vis de cette activité.

2.2. Résultat des témoins positifs (Antibiogramme)

Un antibiogramme permet de tester sur milieu de culture, l'action des molécules antibiotiques sur une souche bactérienne, il donnera donc des indications sur l'efficacité *in vitro* de ces antibiotiques.

L'antibiotique diffuse à partir du disque en créant un gradient de concentration, la figure suivante résume l'ensemble de ces témoins positifs :

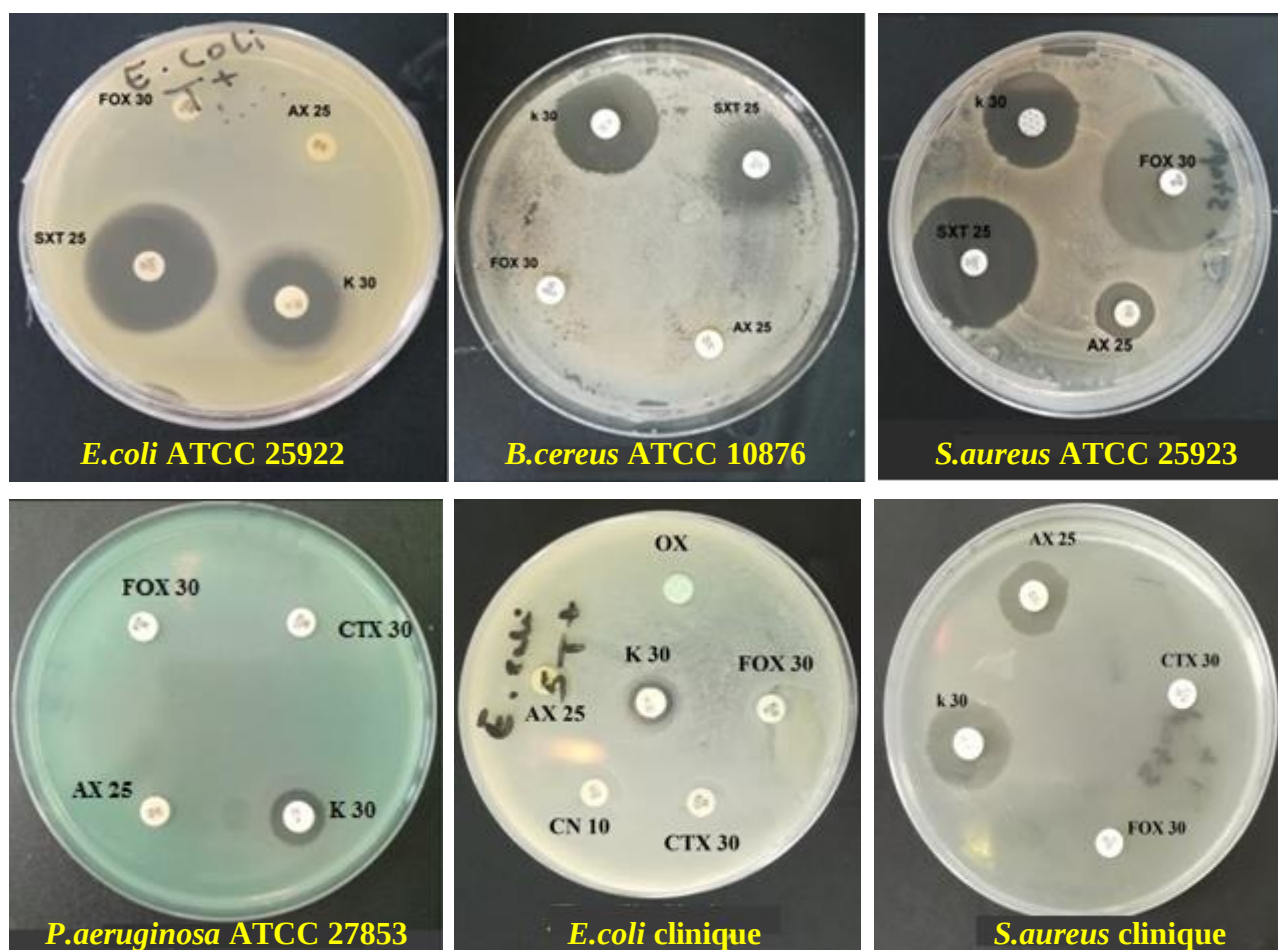


Figure 8 : Photographies des témoins positifs des souches de références et cliniques testées vis-à-vis les antibiotiques : Céfoxitine (Fox 30), Sulfaméthoxazole / Triméthoprime (SXT 25), Kanamycine (K 30), Amoxicilline (AX 25), Céfotaxime (CTX 30), Oxacilline (OX), Céfalexine (CN).

La détermination des diamètres des zones d'inhibition permet une estimation de caractère de sensibilité ou de résistance de la souche bactérienne vis-à-vis les antibiotiques utilisés, les résultats de l'antibiogramme sont consignés dans le tableau VIII qui suit :

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

		Les antibiotiques utilisés et les diamètres des zones d'inhibition (mm)						
Souches bactériennes		FOX 30	SXT 25	AX 25	K 30	CN 10	CTX 30	OX
Souches de références	<i>E.coli</i> ATCC 25922	-	27	-	17	NT	NT	NT
	<i>S.aureus</i> ATCC 25923	35	30	16	23	NT	NT	NT
	<i>B. cereus</i> ATCC10876	-	16	-	23	NT	NT	NT
	<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	9	NT	NT	NT
Souches cliniques	<i>E.coli</i>	-	NT	-	9	-	-	-
	<i>S. aureus</i>	-	NT	15	19	NT	-	NT

NT : non-testé.

(-) aucune zone (diamètre du disque d'antibiotique).

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

D'après les tableaux VIII et III (matériel et méthodes), l'examen réalisé avec *S. aureus* ATCC 25923 montre que cette souche est sensible aux antibiotiques utilisés, contrairement à la souche clinique *S. aureus* qui se montre résistante aux antibiotiques : Amoxicilline (AX 25), Céfoxitine (Fox 30) et Céfotaxime (CTX 30). En ce qui concerne les deux souches : *E. coli* ATCC 25922 et *B. cereus* ATCC 10876 sont très sensibles aux Kanamycine (K 30) et Sulfaméthoxazole (SXT 25) et résistantes à l'Amoxicilline (AX 25) et Céfoxitine (Fox30).

En revanche, la souche *P. aeruginosa* ATCC 27853 testé est la plus résistante, elle ne manifeste aucune sensibilité vis-à-vis les antibiotiques utilisés.

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

Les HEs sont reconnues par leurs composants naturels, comme les monoterpènes, diterpènes et les hydrocarbures avec des groupes fonctionnels divers. Dans les années 1990, MUANZA et ses collaborateurs, ont recherchés des extraits de plantes potentiellement bioactifs contre les bactéries. Depuis, beaucoup d'autres chercheurs ont rapporté l'effet antimicrobien et antifongique des HEs dans l'application agroalimentaire, la recherche pharmaceutique et dans d'autres domaines (BENCHEQROUNE *et al.*, 2012).

3.1. Résultats du test de sensibilité des souches bactériennes à l'HE de *Cedrus atlantica*

Pour l'HE de *C. atlantica*, les résultats de l'activité antibactérienne sont résumés dans la figure et le tableau suivants :

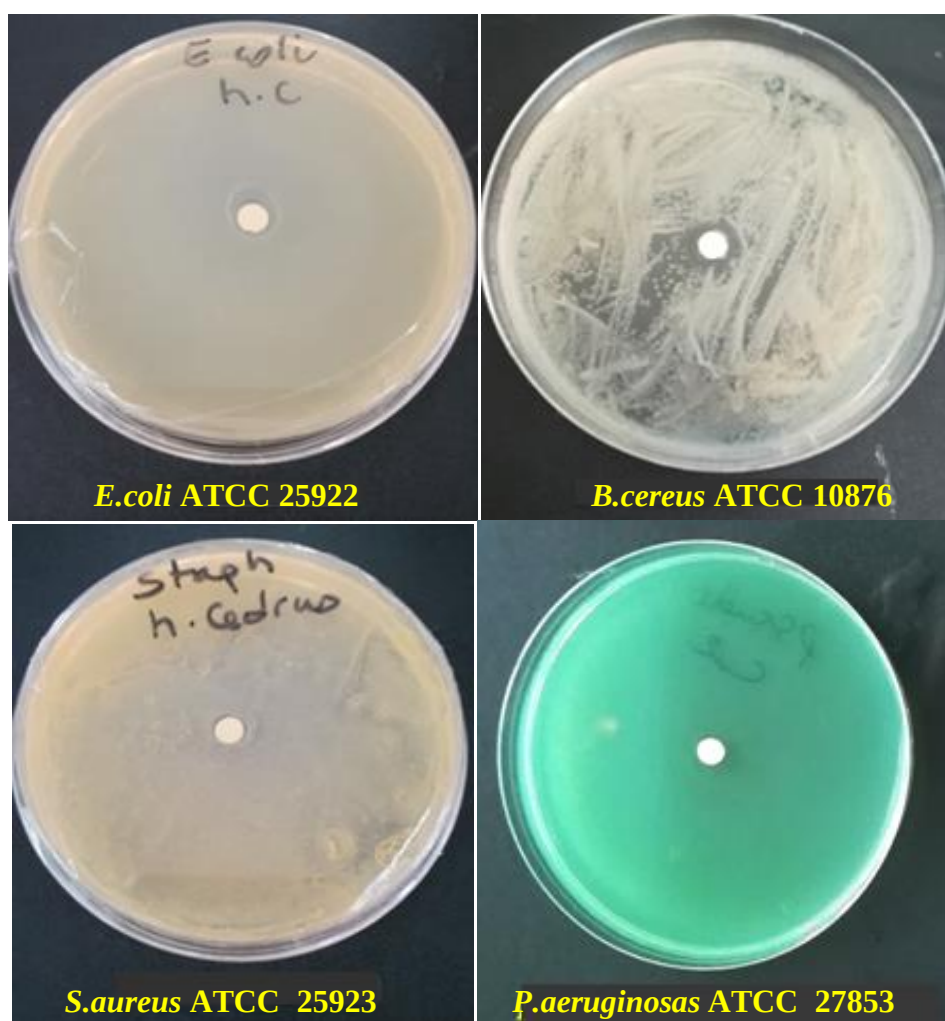


Figure 9 : Photographies des résultats du test de sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis de l'huile essentielle de *Cedrus atlantica*.

Tableau IX : Résultats des diamètres des zones d'inhibition en mm (moyenne $\pm$ écart type) de l'activité antibactérienne de l'HE de *C. atlantica*.

<i>Cedrus atlantica</i>		
Souches bactériennes de références	Diamètres des zones d'inhibition (mm) en moyenne des deux essais $\pm$ l'écart type	Sensibilité
<i>E. coli</i> ATCC 25922	9 $\pm$ 0,00	+
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	7 $\pm$ 0,00	-
<i>Bacillus cereus</i> ATCC10876	9 $\pm$ 0,00	+
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	6 $\pm$ 0,00	-

Les résultats obtenues par la méthode de diffusion des disques pour le pouvoir antibactérien nous indiquent que l'HE du cèdre n'a pas une efficacité antibactérienne où les diamètres des zones d'inhibition sont trop faibles (jusqu'à ne rien obtenir).

Concernant les composés majoritaires de l'HE de *Cedrus atlantica* selon la bibliographie sont : E- α -atlantone (28,75%), le β -himachalène (14,62%), l'himachalol (7,11%). Ils sont tous des composés terpéniques, qui ne présentent aucun pouvoir antibactérien (ABERCHANE *et al.*, 2003).

L'étude de SATRANI *et al.* (2006), ont montré que plusieurs microorganismes testés à l'HE de *Cedrus atlantica* sont inhibés complètement. Ce pouvoir est dû essentiellement à sa composition chimique riche en alcools terpéniques (himachalol, cedros, isocedranol et 1-epicubenol) dont le taux global atteint environ 24,40%. Par contre ABERCHANE *et al.* (2003), ont constaté que l'HE issue de *cedrus atlantica* ne possède *in vitro* aucun pouvoir antibactérien, cela confirme les résultats obtenus dans notre travail.

3.2. Résultats du test de sensibilité des souches bactériennes à l'HE d'*Origanum compactum*

Les deux figures 10 et 11 qui suivent, montrent les zones d'inhibition observées avec l'ensemble des bactéries de références et cliniques pour l'HE d'origan. Le tableau XI renseigne sur les diamètres des zones d'inhibition en mm qui sont la moyenne des deux essais.

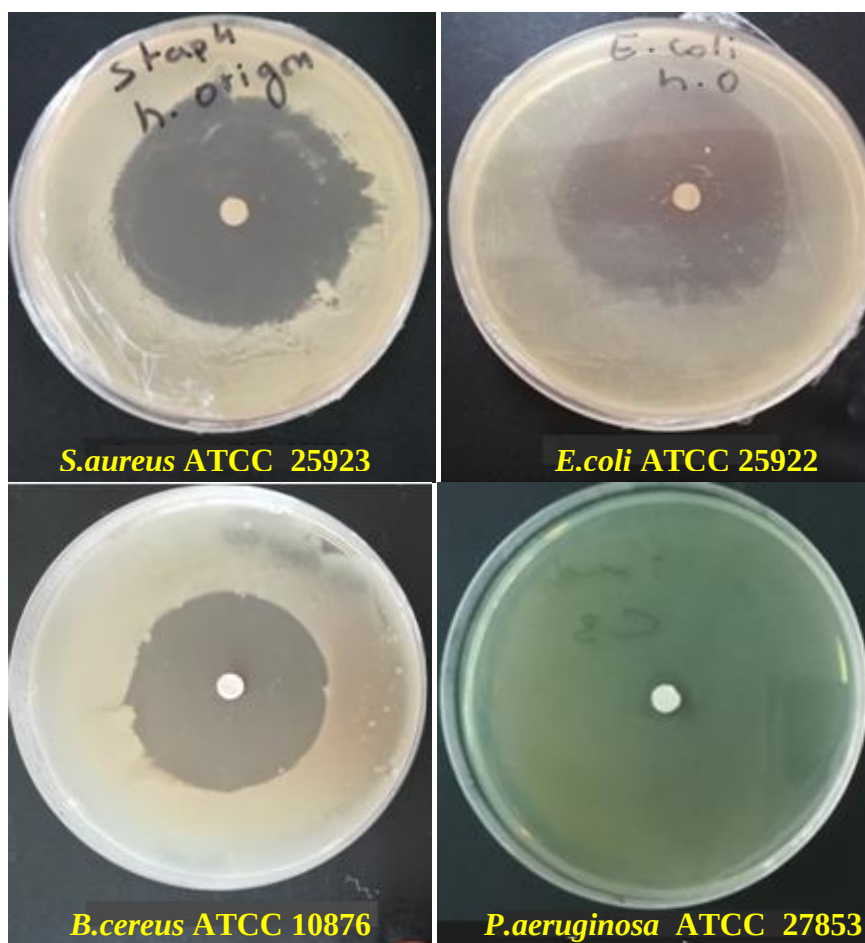


Figure 10 : Photographies du test de sensibilité des souches bactériennes de références vis-à-vis de l'huile essentielle d'*Origanum compactum*.

Après avoir obtenue des zones d'inhibition importante avec cette huile sur l'ensemble des souches de références, on a continuées notre travaille par évaluation de son activité sur des souches cliniques résistantes.

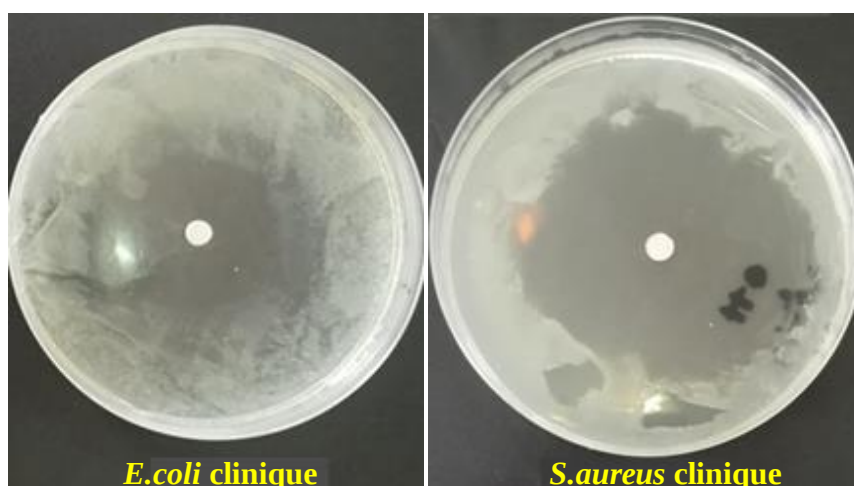


Figure 11 : Photographies du test de sensibilité des souches bactériennes cliniques vis-à-vis de l'huile essentielle d'*Origanum compactum*.

Tableau X : Résultats des diamètres des zones d'inhibition en mm (moyenne $\pm$ écart type) de l'activité antibactérienne de l'HE d'*Origanum compactum*.

<i>Origanum compactum</i>			
Souches bactériennes		Diamètres des zones d'inhibition en moyenne des deux essais $\pm$ l'écart type	Sensibilité
Souches de références	<i>E.coli</i> ATCC 25922	39 $\pm$ 0,88	+++
	<i>S.aureus</i> ATCC 25923	61 $\pm$ 1,08	+++
	<i>B. Cereus</i> ATCC10876	29 $\pm$ 0,05	+++
	<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	13 $\pm$ 0,00	+
Souches cliniques	<i>E.coli</i>	37 $\pm$ 0,00	+++
	<i>S. aureus</i>	52 $\pm$ 3,5	+++

D'après les figures 10 et 11, et les résultats du tableau précédent, on remarque que l'HE d'*Origanum compactum* a montré une forte activité significative contre la plus part des microorganismes testées : *S. aureus* ATCC 25923 ; *E. coli* ATCC 25922 et *B. cereus* ATCC 10876 ainsi que *S. aureus* clinique et *E. coli* clinique d'où les plus grandes zones d'inhibition de cette huile sont observées dans le cas de *S. aureus* ATCC 25923 et *S. aureus* clinique avec des diamètres de 61 mm et 52 mm respectivement. Quant au *P. aeruginosa* ATCC 27853 cette huile n'a pu inhiber sa croissance.

Comparativement aux antibiotiques utilisés, l'effet inhibiteur de cette HE sur la croissance de la plupart des souches testés est meilleur puisque les diamètres des zones d'inhibition obtenus sont supérieurs à ceux obtenus vis-à-vis les antibiotiques utilisés.

Habituellement, les bactéries à Gram négatif sont connues pour leur résistance à l'effet inhibiteur des HEs par rapport aux bactéries à Gram positif, et ce grâce à la structure particulière de leur membrane externe (AKBILI *et al.*, 2016). D'après nos résultats, on remarque que le type de Gram n'a pas d'influence sur l'efficacité des deux HEs testées vue que les zones d'inhibition de l'huile d'origan pour *S. aureus* ATCC 25923 (Gram positif) est de 61 mm, 29 mm pour *B. cereus* ATCC 10876 qui est aussi un Gram positif et 36 mm pour *E. coli* ATCC 25922 (Gram négatif) ; on constate alors que l'activité de l'HE d'*Origanum compactum* testé ne varie pas en fonction de type de Gram.

Concernant le *Pseudomonas aeruginosa*, cette bactérie est connue pour sa résistance à n'importe quel genre d'agents antimicrobiens. En réalité, ce comportement n'est pas étonnant parceque le *P. aeruginosa* a une capacité de former un biofilm (une organisation complexe composée de différentes strates dans lesquelles les bactéries se retrouvent en conditions physiologiques spécifiques à leur situation) (ABI-AYAD *et al.*, 2011).

D'après El MALKI *et al.*(2018), qui ont évalué la composition chimique et l'activité antimicrobienne de l'HE extraite d'*O. compactum* obtenus de plantes aromatiques Marocaines ont révélé que cette huile a montré une activité antibactérienne très significative contre les souches testées (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*) avec des fortes zones d'inhibition dont le diamètre est compris entre 29,33 mm et 48 mm, en particulier contre *P. aeruginosa* qui présentaient une résistance avec un diamètre d'inhibition égal à 14,61 mm. Nos résultats concordent avec ces travaux mis à part quelques différences moindres dans les diamètres des zones d'inhibition.

Selon les travaux de BOUHDID *et al.* (2008), l'HE d'*O. compactum* a été testé contre six Gram positif dont *Staphylococcus aureus*, et quatre bactéries Gram négatives dont *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*. Les résultats ont montré une inhibition de la croissance de toutes ces bactéries. Ces résultats concordent avec les nôtres sauf pour *P.aeruginosa* qui se montre très résistante.

En (2009), BOUHDID *et al.* ont étudié les effets cellulaires de l'HE d'*Origanum compactum* sur *P. aeruginosa* et *S. aureus*. Cette dernière a montré une forte activité antibactérienne contre ces deux souches.

Les HEs présentent une activité antimicrobienne importante due à la présence de teneurs élevées de métabolites secondaires de types terpènes alcools, aldéhydes ou phénoliques. Plusieurs travaux ont démontré que le carvacrol est le constituant majeur de l'*O. Compactum* (55,28%) suivi de γ -terpinène (13,97%), p-cymène (11,51%) et thymol (7,8%). Ces derniers, tels que le carvacrol, le thymol, sont capables de former des liaisons hydrogène avec les sites actifs des enzymes microbiennes et peuvent ainsi contribuer aux effets antimicrobiens des HEs (BOUHDID *et al.*, 2009 ; Bakkali *et al.*, 2018). De plus, plusieurs études ont montré que l'activité antimicrobienne des HEs n'est pas toujours attribuée aux principaux composés, mais peut être due aux interactions de synergisme ou antagonisme avec d'autres composés mineurs (EL MALKI *et al.*, 2018).

En ce qui concerne le mode d'action, l'efficacité antibactérienne des HEs riches en carvacrol et en thymol comme le cas de l'HE d'*O. compactum* est expliquée par la position du groupement hydroxyle sur la structure phénolique de ces molécules et qui agiraient en se fixant sur les groupes amine et hydroxylamine des protéines membranaires des bactéries provoquant une fuite de K (potassium) intracellulaire à partir des cellules ; altération du potentiel membranaire et une altération dans la membrane bactérienne. Ces altérations conduisent à la perte de perméabilité sélective membranaire et donc à l'inhibition d'activité respiratoire, ainsi que la perte d'autres enzymes essentielles, tous ces changements conduisent à la mort cellulaire (AKBLI *et al.*, 2016 ; BOUYAHYA *et al.*, 2016 b).

L'HE d'origan inhibe les Gram positif et les Gram négatif, cependant, dans une étude sur les effets du carvacrol et thymol, il a été démontré qu'ils agissent différemment contre les espèces à Gram positif et les espèces à Gram négatif. Le carvacrol et le thymol sont capables d'accéder au périplasme des bactéries Gram négatives à travers la protéine porine

de la membrane externe, libérant des lipopolysaccharides (LPS) et induisant l'augmentation de la perméabilité de la membrane cytoplasmique vers l'ATP. D'autres études ont clairement démontré que le thymol et le carvacrol ont désintégrés la membrane externe de *E.coli* (LAMBERT *et al.*, 2001 ; BOUYAHYA *et al.*, 2016 b). Selon BOUYAHYA *et al.* (2016)b, qui ont étudié l'action de l'HE d'*O. compactum* sur la morphologie et le fonctionnement de *P. aeruginosa* ont montré que cette dernière tue la cellule de *P. aeruginosa* en perturbant la fonction de la membrane, conduisant à une perte de constituants, comme observé avec fuite d'ion K^+ (potassium).

D'autre part, des études de *B. cereus* ont montré que le carvacrol interagit avec la membrane cellulaire qu'il dissout dans la bicouche phospholipidique et ajustement entre les chaînes d'acides gras qui conduit la perméabilité de la cellule. Des résultats similaires ont été obtenus pour *S. aureus* dont les cellules exposées à l'huile d'origan ont révélé des altérations morphologiques cela indique que cette huile et ses composants ont altéré la membrane cellulaire (BOUHDID *et al.*, 2009 ; BOUYAHYA *et al.*, 2016 b).

Pour une HE, l'efficacité antimicrobienne est principalement due aux teneurs et à la nature des constituants qui peuvent agir séparément ou en synergie, cependant, la comparaison de l'efficacité des HEs à travers les différentes publications reste difficile à établir. Cette difficulté réside dans le fait que les paramètres expérimentaux (méthodes employées pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne, choix et conditions physiologiques des microorganismes, période de l'exposition du microorganisme à l'HE, dose de l'HE utilisée, émulsifiant utilisé pour la solubilisation de l'HE) diffèrent entre les études (El MALKI *et al.*, 2018).

4. Résultats des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'huile essentielle d'*Origanum compactum*

À 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 faibles valeurs pour éviter les effets toxiques des HEs.

Après avoir démontré l'effet inhibiteur de l'HE d'*O. compactum* sur la croissance des souches testées : *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *B. cereus* ATCC 10876, les CMI de ces dernière ont été déterminées afin d'évaluer la concentration minimale de cette HE qui inhibe la croissance et la prolifération visible des germes en 24h. Les figures 12 ; 13 ; et 14, regroupent les résultats obtenus pour le calcul de la CMI.



Figure 12 : Série de dilution réalisée afin de déterminer la CMI en milieu liquide de l'HE d'*Origanum compactum* sur la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

D'après la figure ci-dessus, on constate que la CMI de l'HE d'*O. compactum* sur *S. aureus* ATCC 25923 qui est contenue dans le tube 6 est de 1,98 $\mu\text{l/ml}$.



Figure 13 : Série de dilution réalisée afin de déterminer la CMI en milieu liquide de l'HE d'*Origanum compactum* sur la souche *Escherichia coli* ATCC 25922.

D'après la figure 13, la CMI de l'HE d'*O.compactum* sur *E. coli* ATCC 25922 est contenue dans le tube 5 et qui est de 3,96 µl/ml.



Figure 14 : Série de dilution réalisée afin de déterminer la CMI en milieu liquide de l'HE d'*Origanum compactum* sur la souche *Bacillus cereus* ATCC 10876.

D'après la figure ci-dessus, on constate que la CMI de l'HE d'*O. compactum* sur *B. cereus* ATCC 10876 qui est contenue dans le tube 7 est de 0,99 µl/ml.

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.

D'après KOBA *et al.* (2004), le pouvoir inhibiteur de l'HE d'*O. compactum* vis-à-vis les souches : *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 et *B. cereus* ATCC 10876 est considéré comme excellent vu que les CMI de ces souches est inférieures à 50 µl/ml.

Pour les bactéries, la concentration 0,99 µl/ml a été suffisante pour inhiber la croissance de *B. cereus* ATCC 10876 (Gram positif) qui s'est montré sensible à cette huile, suivi du *S. aureus* ATCC 25923 (Gram positif) avec une concentration de 1,98 µl/ml et de *E. coli* (Gram négatif) qui a été inhibé à partir de la concentration minimale 3,96 µl/ml.

Vu que les premières fractions de tous les tests réalisés (les quatre premiers tubes) présentent un trouble et un changement de couleur, on a réalisé une gamme décroissante en concentration de l'HE d'origan dans des tubes contenant le milieu BHIB sans rajouter une suspension bactérienne, puis on les a incubés pendant 24h à 37°C. Les résultats sont présentés dans la figure suivante :



SM : Solution Mère

HO : Huile d'Origan

Figure 15 : Série de dilutions décroissantes en concentration d'HE d'*Origanum compactum* en milieu liquide (BHIB) sans suspension bactérienne ainsi le témoin positif et négatif.

D'après la figure précédente n°15, on constate que, l'augmentation de la température agit sur la turbidité du mélange de BHIB et l'HE d'origan ainsi sa couleur.

5. Résultats de la nature de l'activité de l'huile essentielle d'*O. compactum* (CMB)

Pour notre étude, la CMB nous permet de tester sur un milieu de culture l'action des molécules des HEs sur des souches bactériennes. La CMB démontre la plus basse concentration de notre HE qui a pu produire une activité antimicrobienne visible sur nos souches d'intérêt.

La figure suivante, montre l'activité de l'HE d'origan sur la souche *S. aureus* ATCC 25923 :

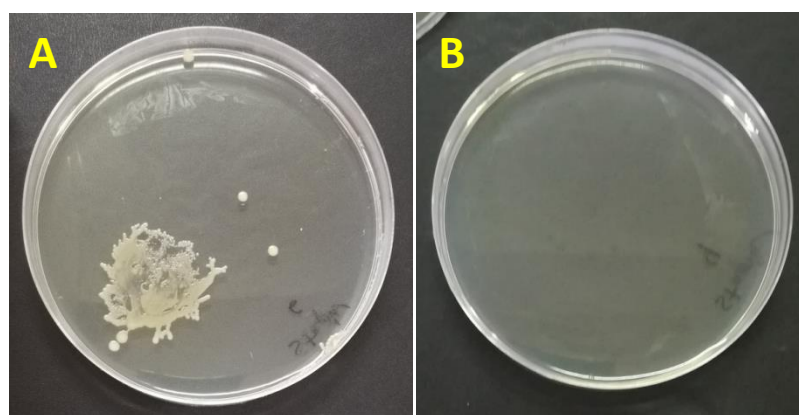


Figure 16 : Résultat d'ensemencement des échantillons tiré du tube n°6 (A) et du tube n°4 (B) où il n'y a pas eu de croissance bactérienne visible de la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

D'après la figure 16, on remarque un développement partiel de *S. aureus* ATCC 25923 sur la boîte de Pétri (A), on déduit alors que à la concentration 1,98 µl/ml, l'huile d'origan exerce un effet bactériostatique sur cette souche.

En revanche, à la concentration 7,92 µl/ml (B), l'huile d'origan exerce un effet bactéricide sur cette souche.

Ensuite, la figure 17 qui suivent, montre l'activité de l'HE d'*O. compactum* sur la souche *E. coli* ATCC 25922 :

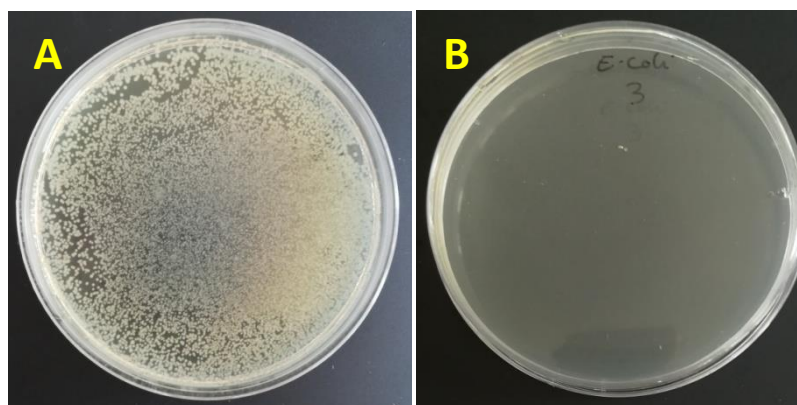


Figure 17 : Résultat d'ensemencement des échantillons tiré du tube n°5 (A) et de tube n°3 (B) où il n'y a pas eu de croissance bactérienne visible de la souche *Escherichia coli* ATCC 25922.

D'après la figure 17, on remarque un développement de *E. coli* ATCC 25922 sur la boîte de Pétri (A), ce qui permet de déduire qu'avec la concentration 3,96 $\mu\text{l/ml}$, l'huile d'origan exerce un effet bactériostatique sur cette souche, en revanche, on remarque une absence totale du développement d'*E. coli* ATCC 25922 à la concentration 15,84 $\mu\text{l/ml}$ (B), on constate alors qu'à cette concentration, l'huile d'origan exerce un effet bactéricide sur cette souche.

Par la suite, la figure suivante montre l'activité de l'HE d'origan sur la souche *B. cereus* ATCC 10876.

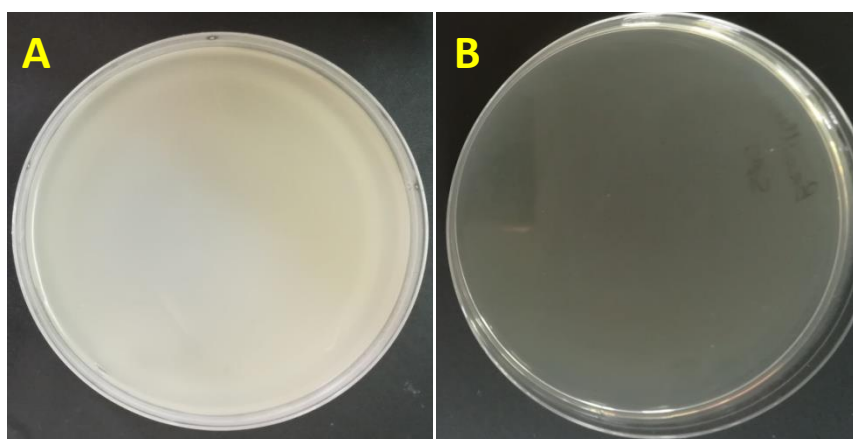


Figure 18 : Résultat d'ensemencement d'un échantillon tiré du tube n°7(A) et de tube de la solution mère (B) où il n'y a pas eu de croissance bactérienne visible de la souche *Bacillus cereus* ATCC 10876.

D'après la figure n°18 , on remarque un développement de *B. cereus* ATCC 10876 sur la boîte de Pétri (A), ce qui permet de déduire qu'à la concentration 0,99 µl/ml, l'huile d'origan exerce un effet bactériostatique sur cette souche, par contre, la concentration (B) qui est de 3,96 µl/ml, confère à cette HE un pouvoir bactéricide vis-à-vis la souche testée.

On constate alors, pour avoir un effet bactéricide sur toutes les souches testées la concentration de l'HE d'origan doit être assez élevée.

Les différentes valeurs de CMI obtenues ainsi les CMBs, nous permettent de constater que l'activité antibactérienne est en fonction de la bactérie, ce qui confirme que le type de microorganismes est un paramètre important déterminant l'activité antibactérienne ainsi la concentration d'huile essentielle utilisée.

Selon EL MALKI *et al.* (2018), l'huile d'origan a montré une activité antibactérienne très significative contre les souches testées avec un effet bactéricide en milieu liquide à des concentrations inférieures ou égales à 0,5 µl/ml, par contre, l'action de cette huile est légèrement inhibitrice pour *P.aeruginosa* avec un effet bactériostatique à une concentration de 1 µl/ml en milieu liquide.

D'après BOUHDID *et al.* (2008), qui ont testé l'HE d'origan contre plusieurs souches, ont montré que toutes les bactéries testées ont été inhibé avec une CMI qui varie de 0,0078 % à 0,125% pour *S. aureus*, et de 0,0625% à 0,125% pour *E. coli*.

Des valeurs aussi obtenu concernant la CIM de l'HE d'origan, ont montré que les Gram positifs sont plus sensible avec une CMI de 0,0312% (V/V) et plus pour les Gram négatifs (WAN *et al.*, 1998).

Les valeurs obtenues étaient plus ou moins comparable à d'autres études publiées, ces différences peuvent être dus à la méthodologie suivi, à l'état physiologique des souches ainsi la composition de l'HE utilisé.

6. Résultats de la combinaison des deux huiles essentielles

On s'intéresse dans cette étude à l'activité des mélanges des deux HEs par trois combinaisons possibles.

6.1. Résultats de la combinaison de l'HE d'*Origanum compactum* (50%) et *Cedrus atlantica* (50%)

Les HEs des plantes médicinales sont des mélanges complexes par leur nature. Etant un mélange cela représente un potentiel pour le développement d'interactions synergiques, additives ou antagonistes.

L'objectif de la présente étude est de déterminer le pouvoir antibactérien des effets synergiques ou antagonismes entre l'HE d'*Origanum compactum* et l'huile de *Cedrus atlantica*, le résultat de cette combinaison est illustré dans la figure suivante :



Figure19 : Photographies du test de sensibilité de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 10876 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 vis-à-vis la combinaison de l'HE d'*Origanum compactum* (50%) et *Cedrus atlantica* (50%).

6.2. Résultats de la combinaison de l'HE d'*Origanum compactum* (25%) et *Cedrus atlantica* (75%)

Les résultats de la combinaison de l'HE d'*O. compactum* (25%) et *C. atlantica* (75%) sur *E. coli* ATCC 25922, *B. cereus* ATCC 10876 et *S. aureus* ATCC 25923 sont présentés dans la figure 20 qui suivent :

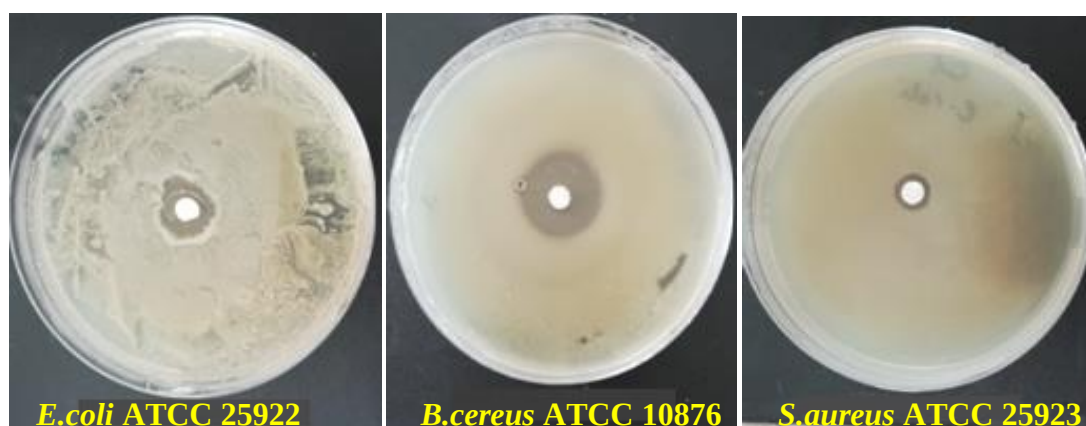


Figure 20 : Photographies du test de sensibilité de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 10876 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 vis-à-vis la combinaison de l'HE d'*Origanum compactum* (25%) et *Cedrus atlantica* (75%).

D'après les deux figures précédentes 19 et 20, on remarque une légère augmentation d'activité sur les deux souches bactériennes : *S. aureus* et *E. coli* par apport à celle déduit par l'HE de *C. atlantica*, et moins par apport à l'activité de l'huile d'*O. compactum* qui a présenté un pouvoir antibactérien important (quatre fois plus) contre ces souches, cela peut s'expliquer par l'effet d'interactions antagonistes entre les deux huiles.

Concernant *B. cereus*, cette souche s'est montré la plus sensible à ces combinaisons avec une valeur élevée à celle déduit par l'HE de *C. atlantica* et une valeur proche à celle de l'activité d'*O. compactum*, notant que toute les zones d'inhibition grandi avec la grande proportion en HE d'origan qui est 50 % et moins à la proportion 25% .

6.3. Résultats de la combinaison de l'HE d'*Origanum compactum* (75%) et *Cedrus atlantica* (25%)

Les résultats de la combinaison de l'HE d'*O. compactum* (75%) et *C. atlantica* (25%) sur *E. coli* ATCC 25922, *B. cereus* ATCC 10876 et *S. aureus* ATCC 25923, sont présentés dans la figure n°21 qui suivent :

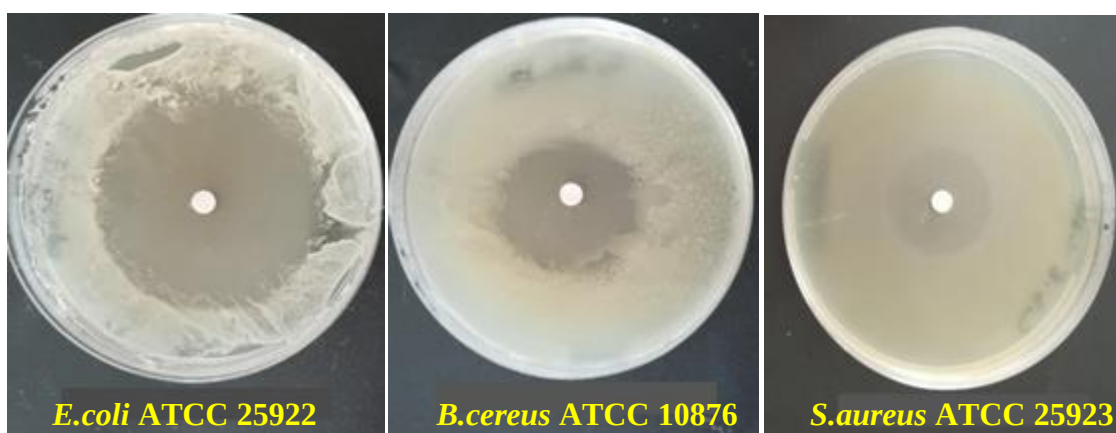


Figure 21 : Photographies du test de sensibilité de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 10876 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 vis-à-vis la combinaison de l'HE d'*Origanum compactum* (75%) et *Cedrus atlantica* (25%).

Cette combinaison sur les trois souches testées donne une activité moins importante par rapport à celle obtenue avec l'HE d'origan seule.

Le terme synergie signifie travailler ensemble, en ce sens que l'effet total du mélange dépasse la somme des effets des composés individuels. L'antagonisme signifie travailler l'un contre l'autre.

Ce résultat signifie que la combinaison des deux huiles présente un effet antagoniste entre les différents constituants biologiques de l'HE d'*O. compactum* et de l'HE de *C. atlantica*, puisque l'HE d'*O. compactum* présente individuellement une forte activité antibactérienne.

La synergie est observée quand l'effet des substances combinées est supérieur à la somme des effets individuels. L'antagonisme est observé lorsque l'effet d'un ou les deux composés est moins quand ils sont appliqués ensemble que lorsqu'il est appliqué individuellement. Les mécanismes produisant l'antagonisme sont moins connus, bien qu'ils impliquent des combinaisons d'agent bactéricide par l'utilisation de composés qui agissent sur la même cible du microorganisme, par exemple, certains hydrocarbures monoterpéniques produisant des effets antagonistes en réduisant la solubilité aqueuse des terpènes et par conséquent, la disponibilité des composants actifs (GONI *et al.*, 2009).

Selon l'étude de KHAOULA *et al.* (2017), un effet puissant a été observé quand un mélange des deux HEs a été utilisé (*O. compactum* et *Tymus vulgaris*), ce qui confirme que un effet synergique peut intervenir dans les HEs. De plus, plusieurs études ont montré que l'activité antimicrobienne des HEs n'est pas toujours attribuée aux principaux composés, mais peut être due aux interactions de synergisme ou antagonisme avec d'autres composés mineurs (EL MALKI *et al.*, 2018).

Toutes fois, les résultats de différentes études ne peuvent être comparés parce que la concentration de l'huile en molécules chimiques est variable et dépend de nombreux facteurs (ROSATO *et al.*, 2007).

7. Activité antifongique des deux huiles essentielles

Les souches fongiques utilisées pour tester l'activité antifongique des deux HEs sont : *Aspergillus niger* et *Candida albicans*.

7.1. Résultats de l'activité anti-*Candida* des deux huiles essentielles

7.1.1. Résultats de témoin négatif et de témoin positif de *Candida albicans*

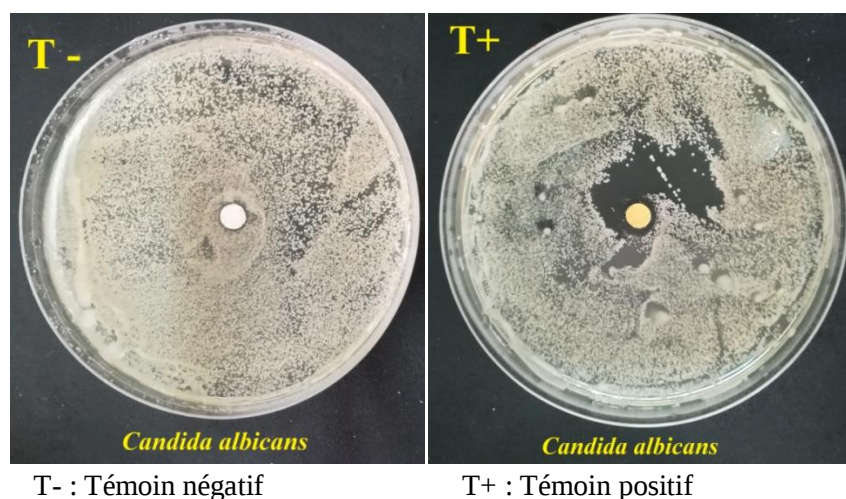


Figure 22 : Photographies de témoin négatif et de témoin positif de *Candida albicans* testée pour l'activité antifongique des deux HEs issues de : *Origanum compactum* et *Cedrus atlantica*.

À partir de la figure précédente n°22, on constate que le DMSO n'a aucun effet sur *Candida albicans* donc ce dernier est inerte vis-à-vis de l'activité antifongique, quant à l'activité qu'exerce l'Amphotéricine B contre cette souche fongique est faible car le diamètre n'est que 10 mm.

7.1.2. Résultats de sensibilité de *C. albicans* vis-à-vis les deux huiles essentielles

La méthode suivie pour l'évaluation de cette activité est la même que celle suivie 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.

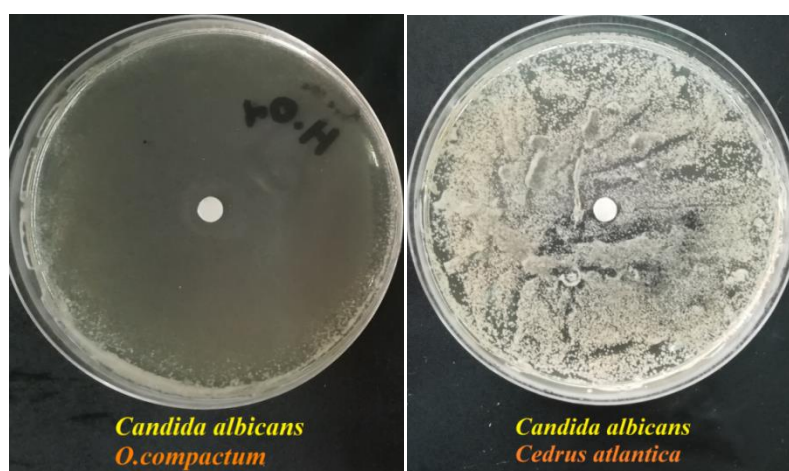


Figure 23 : Photographies de sensibilité de *C. albicans* testée pour l'activité antifongique des deux HEs issues de : *Origanum compactum* et *Cedrus atlantica*.

Les diamètres des zones d'inhibition ainsi que la sensibilité de *C.albicans* vis-à-vis les deux HEs issues de : *O. compactum* et *C. atlantica* sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau XI : Résultats des diamètres des zones d'inhibition en mm (moyenne $\pm$ l'écart type) de l'activité anti-*Candida* des deux huiles essentielles.

<i>Candida albicans</i>		
Huiles essentielles	Diamètres d'inhibition (mm) en moyenne des deux essais $\pm$ l'écart type	sensibilité
<i>Origanum compactum</i>	70 $\pm$ 1,04	+++
<i>Cedrus atlantica</i>	-	-

- : aucune zone (Diamètre de disque)

À partir de la figure n°23 et les résultats des diamètres des zones d'inhibition mentionnés dans le tableau précédent, on constate que l'HE d'origan compact possède une activité très importante vis-à-vis de *Candida albicans*, quant à celui de cèdre ne révèle aucune activité.

Nos résultats concordent avec celles de ABERCHANE *et al.* (2003), qui ont montré l'absence d'activité anti-*Candida* de cette huile. Ils ont montré que l'inefficacité antifongique est principalement due aux teneurs et à la nature de ces constituants.

Quant à SATRANI *et al.* (2006), ont évalué un pouvoir fongicide important de l'huile de cèdre sur des champignons. Ce résultat est dû essentiellement à sa composition chimique riche en alcools terpeniques (himachalol, isocedranol et 1-epicubenol) selon leur étude.

Les différences observées entre les activités antifongiques des deux HEs étudiées peuvent être attribuées à des différences dans leurs fractions actives, donc il convient de noter qu'il existe une sensibilité différentielle des souches testées vis-à-vis des deux HEs étudiées.

7.1.3. Résultats de CMI et CMB de l'huile essentielle d'*Origanum compactum*

La CMI et la CMB de l'HE d'*O. compactum* ont été déterminés sur *C. albicans*. Les concentrations utilisées vont de 63,38 à 0,12 μ l d'HE/ml, et les résultats sont présentés dans les deux figures 24 et 25 :



Figure 24 : Série de dilution réalisée afin de déterminer la CMI en milieu liquide de l'HE d'*O. compactum* sur la souche *Candida albicans*.

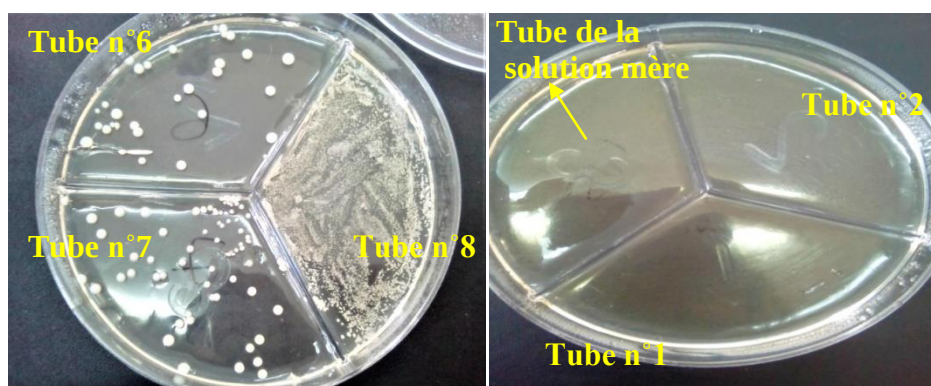


Figure 25 : Résultats d'ensemencement des échantillons tirés des tubes de la série de dilution où il n'y a pas eu de croissance bactérienne visible de la souche *C. albicans*.

D'après les deux figures 24 et 25, on constate que la CMI de l'HE d'origan sur *C. albicans* qui est contenue dans le tube 7 est de 0,99 $\mu\text{l/ml}$. D'après KOBA *et al.* (2004), le pouvoir inhibiteur de l'HE d'origan vis-à-vis cette souche est considéré comme excellent vu que la CMI de *C. albicans* est inférieure à 50 $\mu\text{l/ml}$. À cette concentration l'HE d'origan exerce un effet bactériostatique vis-à-vis cette souche, quant à la concentration 31,96 $\mu\text{l/ml}$, l'huile essentielle d'*Origanum compactum* exerce un effet bactéricide.

La gestion des infections fongiques pose de nombreux problèmes, y compris un nombre limité des médicaments antifongiques, la toxicité et la résistance aux médicaments antifongiques couramment utilisés. Pour cela, il est très important et nécessaire de découvrir nouveaux agents antifongiques pour lutter contre les souches exprimant la résistance aux médicaments antifongiques disponibles. Un des produits naturels utilisés comme agent thérapeutique contre les champignons est l'origan (FADEL *et al.*, 2013).

L'effet inhibiteur de l'HE d'origan était principalement dû aux deux composants les plus abondants, à savoir le thymol et le carvacrol. L'étude de AHMED *et al.* (2010), a montré que ces derniers présentent une forte activité inhibitrice vis-à-vis de *C. albicans* avec un diamètre qui varie de 2,20 mm à 2,34 mm, pour notre travail elle est plus de 7,00 mm.

D'après MANOHAR *et al.* (2001), la concentration 0,25 mg/ml de l'huile d'*Origanum* inhibe complètement la croissance de *C. albicans* en culture ; la concentration 0,062 mg/ml pendant 24h est suffisante pour inhiber la production de la formation du tube germinatif, par contre l'effet fongicide à 48h nécessitait le double de la concentration (0,125 mg/ml).

7.2. Résultats de l'activité anti- *Aspergillus* des deux huiles essentielle

7.2.1. Résultats de sensibilité d'*Aspergillus niger* vis-à-vis de l'huile essentielle de *C.atlantica*

Pour l'évaluation de l'activité anti-*Aspergillus*, nous avons suivi la méthode de contact direct où les diamètres des zones de croissance du mycélium sont mesurés et comparé à celui de témoin négatif.

Pour l'huile de cèdre d'Atlas, le résultat de son test d'activité anti- *Aspergillus niger* observé après neuf jours d'incubation à 30°C est résumé dans la figure suivante :

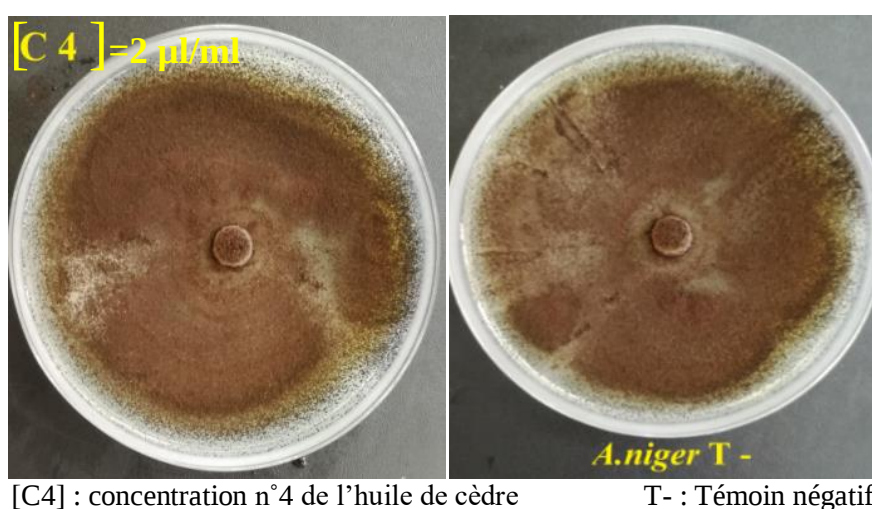


Figure 26 : Photographies de témoin négatif d'*Aspergillus niger* et son test de sensibilités vis-à-vis de l'huile essentielle de *C. atlantica*

À partir de cette figure, on constate que le DMSO n'a aucun effet sur *Aspergillus niger* donc ce dernier est inerte vis-à-vis de l'activité antifongique. On note aussi qu'aucune des concentrations n'ont pu inhiber la croissance mycéliennes d'*Aspergillus niger* vue que les diamètres de la croissance mycélienne se développent à la même vitesse même à la plus grande concentration de 2 µl/ml qui corresponde à un volume de 30 µl de cette huile.

Nos résultats obtenus pour cette étude concordent avec ceux de GHAFOURI *et al.* (2014), qui ont étudié l'activité antifongique de l'HE de cèdre récoltés au Maroc contre *A. niger*. Ces derniers n'ont enregistré aucune inhibition avec cette huile et ceci est principalement dû à leur composition chimique riche en hydrocarbures terpéniques et pauvre en terpènes phénoliques.

7.2.2. Résultats de sensibilité d'*Aspergillus niger* vis-à-vis de l'huile essentielle d'*O. compactum*

La figure suivante présente le résultat de témoin négatif d'*Aspergillus niger* et son test de sensibilités vis-à-vis de l'huile d'origan pendant neuf jours d'incubation à 30°C.

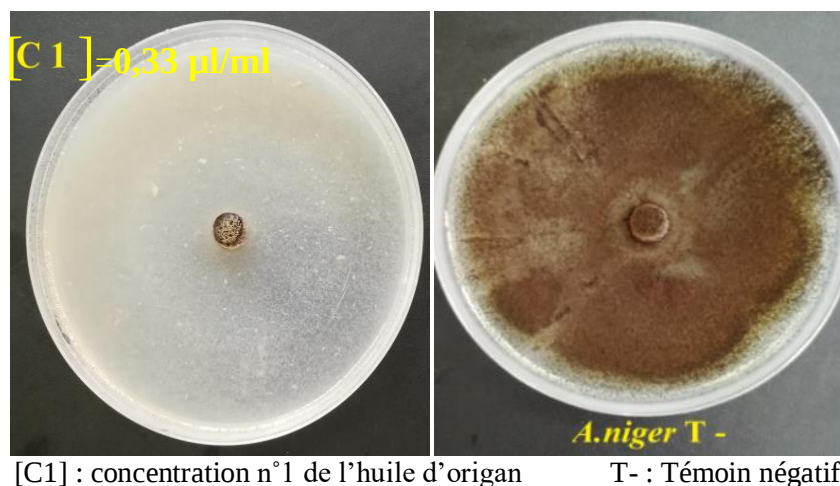


Figure 27 : Photographies de témoin négatif d'*Aspergillus niger* et son test de sensibilités vis-à-vis de l'huile essentielle d'*O. compactum*

On constate qu'avec une concentration de 0,33 µl/ml et qui correspond à un volume de 5 µl, l'huile d'origan a carrément inhibé la croissance d'*Aspergillus niger*, donc il possède une très forte activité vis-à-vis cette souche, et c'est le cas pour toutes les concentrations testées qui sont plus élevées à cette dernière. Cela permet de déduire que certaines molécules même en petite quantité peuvent être très actives.

D'après les deux figures précédentes 26 et 27, on remarque que l'HE d'*O. compactum* est plus actif que celui de *C. atlantica*. Il possède une activité antifongique puissante vis-à-vis le développement mycélien d'*Aspergillus niger* ou aucune spore n'a pu proliférer, contrairement à l'HE de cèdre, le développement mycélien atteint les bords de la boîte de Pétri.

Selon l'étude de CHEBLI *et al.* (2003), sur la composition chimique et l'activité antifongique de sept HEs Marocaines dont l'huile d'origan compact sur les champignons, ont démontré que les extraits d'éther de pétrole d'*O. compactum* étaient très actifs contre la croissance mycélienne des champignons qui pourrait être dû à ses niveaux élevés de carvacrol, p-cymène, thymol et terpinène. Les mécanismes de toxicité des phénols totaux

d'origan contre les champignons sont basés sur l'inactivation des enzymes fongiques contenant le groupe SH dans leurs sites actifs.

Nos résultats obtenus pour l'activité antifongique de *C. atlantica* et l'*O. compactum* semblent en accord avec ceux rapportés par les deux études précédentes. Mais plusieurs études montrent des différences qui peuvent être due à plusieurs facteurs.

Selon LAIB (2012), l'activité antifongique d'une huile essentielle est en relation avec sa composition chimique, les groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) et les effets synergiques entre les composants. Ainsi, la nature des structures chimiques qui la constituent, mais aussi leurs proportions jouent un rôle déterminant.

8. Résultats de l'activité anti-*Aspergillus in vivo* de l'huile d'origan compact

La qualité microbiologique d'un aliment constitue l'une des bases essentielles de son aptitude à satisfaire la sécurité du consommateur. Après avoir démontré *in vitro* la forte activité antifongique de l'HE d'*O. compactum*, nous avons essayé d'évaluer *in vivo* son activité anti-*Aspergillus niger* sur des fruits de pomme dans le but de l'utiliser comme un conservateur alimentaire naturelle.

ATTRASSI *et al.* (2008), ont réussi à isoler et à identifier à partir des pommes pourries en conservation collectées dans différentes chambres froides plusieurs espèces fongiques, parmi eux *A. niger*. Ils ont démontré que cette souche provoque des altérations et des pourritures des pommes lors de sa conservation.

Dans cette étude, deux méthodes d'application de l'HE d'*O. compactum* ont été utilisées (méthode de contact direct et méthode de micro-atmosphère) afin de déterminer son activité antifongique sur des fruits de pomme pendant trois semaines à température ambiante. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure suivante n°28 :

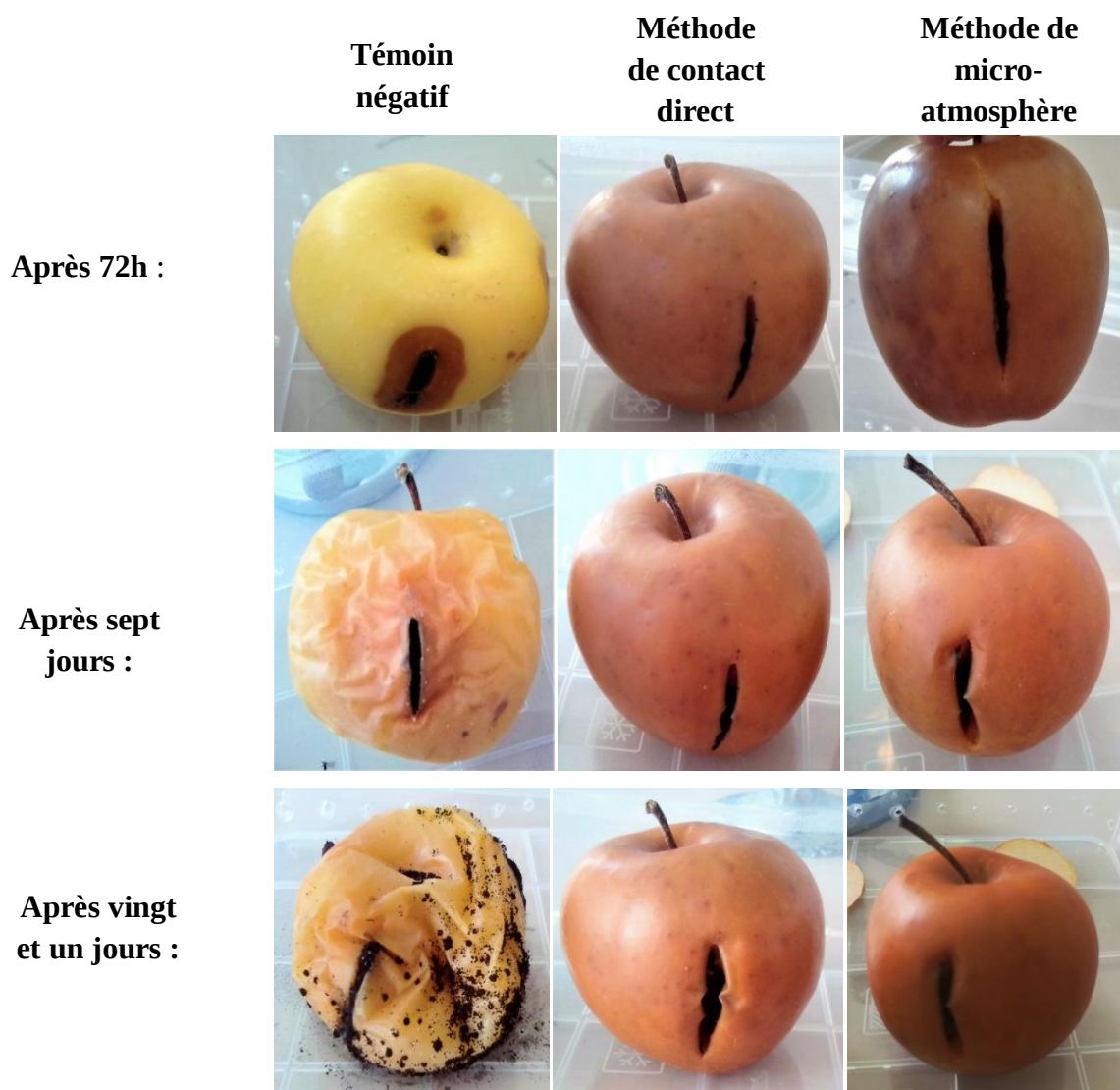


Figure 28 : Photographies des tests de sensibilités d'*A. niger* vis-à-vis de l'HE d'*O.compactum* appliquée sur des fruits de pomme ainsi le témoin négatif.

Après 72h d'incubation, le témoin négatif a montré un développement léger d'*Aspergillus niger*. En revanche, on remarque qu'avec les deux méthodes utilisées l'HE d'origan à inhiber la croissance de cette souche. Notant que l'utilisation de cette huile a influencé sur la couleur de pomme.

Après sept (7) jours pour le témoin négatif, les spores d'*A. niger* ont réussi à se développer dans la pomme et a provoquer des altérations et des pourritures ainsi des changements de la texture. Par contre, en présence de l'HE aucune spore n'a pu développer ou provoquer des pourritures ou modifier la texture de la pomme.

En vingt et un jours, une différence significative est observé entre le témoin négatif et les pommes contenues l'HE d'origan. On remarque qu'en absence de l'HE d'origan, les

spores d'*A. niger* germinent avec une croissance mycélienne à la surface de la pomme ainsi une altération de la texture de la pomme. En revanche, la présence de l'huile essentielle a permis pour la pomme de garder la même texture pendant 21 jours et à inhiber totalement la croissance mycélienne d'*A. niger* et l'évolution de la pourriture provoquée par cette souche.

In vitro et *in vivo*, l'HE d'*O. compactum* donne des résultats satisfaisants sur l'inhibition de la croissance et la germination de cette espèce notant que les deux méthodes utilisées pour l'application de l'HE ont donné le même résultat. Cela permet de déduire que cette souche fongique est extrêmement sensible aux composés volatiles de l'huile essentielle d'*O. compactum* qui est selon SERRANO *et al.* (2008) et LAGHCHIMI *et al.* (2014), un caractère recherché dans le domaine de l'emballage des fruits de pomme, porté sur l'utilisation de ces composés volatils comme un moyen de base dans les emballages actifs capables de libérer lentement ces substances actives dans l'espace libre.

RASOOLI *et al.* (2006), ont révélé des altérations et des lyses de la paroi des hyphes des champignons traités avec des HEs et ces modifications peuvent être liées à l'effet de l'huile essentielle comme réactions enzymatiques régulant la synthèse des parois.

À l'essor de cette étude, nous pouvons conclure que l'huile essentielle d'*O. compactum* pourrait être considérée comme un agent conservateur très important pour l'industrie alimentaire, il est capable d'empêcher et de réduire la croissance mycélienne responsable d'altération des aliments, mais selon DELVAL *et al.* (2010), son application reste complexe à cause de la faible miscibilité des huiles essentielles dans les matrices aqueuses.

D'après ces études et la nôtre on peut conclure que l'évaluation de l'activité antifongique *in vitro* et *in vivo* 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. Ce dernier peut 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 utiliser pour la préservation de la nourriture ou à des fins médicales, les problèmes de sécurité et de toxicité devront être abordés.

Conclusion et Perspectives

À travers l'étude de l'activité antibactérienne et antifongique des deux huiles essentielles provenant de deux plantes aromatiques : *Origanum compactum* (origan) et *Cedrus atlantica* (cèdre) vis-à-vis des souches bactériennes pathogènes et multirésistantes ainsi que des souches fongiques (levure et moisissures), il apparaît que celui d'origan possède un pouvoir antibactérien et antifongique naturellement puissant sur les souches testées d'où l'inhibition de la croissance varie en fonction de l'espèce microbienne. En revanche, l'HE du cèdre n'a pas une efficacité antibactérienne où les diamètres des zones d'inhibition sont trop faibles (jusqu'à ne rien obtenir).

Nos résultats montrent que l'EH d'origan pourraient probablement rivaliser les produits chimiques synthétiques et les antibiotiques qui sont utilisés dans les traitements des maladies infectieuses et expliquent l'usage traditionnel massif de cette espèce par les populations.

Subséquentement, nous pouvons conclure que cette huile peut être considérée comme un agent conservateur alternative aux conservateurs synthétiques déjà employé, très prometteur pour l'industrie alimentaire et capable d'empêcher la prolifération des moisissures et de réduire la croissance mycélienne responsable d'altération des aliments.

À l'essor de la présente étude, il serait intéressant de mener une étude plus approfondie sur l'huile essentielle d'origan dans le but de poursuivre ce travail, et dans la perspective de tendre vers une nouvelle génération de plate formes intégralement saine, il serait donc nécessaire :

- D'étudier l'activité antioxydante de cette huiles essentielle ;
- D'approfondir les recherches sur une large gamme de souches microbiennes et d'identifier les constituants actifs responsables de l'activité antibactérienne concernant l'huile d'origan ;
- D'élargir le panel des activités biologiques par d'autres tests : anti-inflammatoire, anticoagulant et anticancéreuse.
- Application réelle sur le terrain de l'huile d'origan soit de son extrait naturel et pure, ou avec une combinaison avec des antibiotiques ou avec des molécules d'origine microbienne afin d'améliorer son activité.

Ajoutant comme perspective, il serait intéressant d'innover de nouvelles méthodes de décontamination des fruits et légumes par l'action de vapeurs de l'huile d'origan et d'utiliser des films d'emballage naturels biodégradables et bioactifs après incorporation d'extraits de cette huile pour assurer l'innocuité et augmenter significativement la durée de conservation des aliments à la place des conservateurs de synthèse.

Cette étude montre l'intérêt des HEs offrant ainsi un patrimoine à préserver, à développer et à valoriser dans la mesure où nos résultats constituent avec ceux des études réalisées auparavant, une base essentielle en faveur de leur exploitation dans le domaine médicale et l'industrie agroalimentaire.

Références bibliographiques

Aberchane M., Satrani B., Fechtal M., Chaouch A. (2003). Effet de l'infection du bois de Cèdre de l'Atlas par *Trametes pini* et *Ungulina officinalis* sur la composition chimique et l'activité antibactérienne et antifongique des huiles essentielles. *Acta Botanica Gallica*. 150(2) : 223-229.

Abi-Ayad M., Abi-Ayad F.Z., Lazzouni H.A., Rebiahi S.A., (2011). Antibacterial activity of *Pinus halepensis* essential oil from Algeria (Tlemcen). *Journal of Natural Product and Plant Resources*. 1(1): 33-36.

Ahmad A., Khan A., Akhtar F., Yousuf S., Xess I., Khan L.A., Manzoor N.(2010). Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. *European Journal of Clinical Microbiology on Infectious Diseases*. 30 : 41-50.

Ait youcef M. (2006). Plants médicinales de Kabylie. Edition Ibis press, Paris.

Akbli M., Rhallabi N., Ait Mhand R., Akssira M., Mellouki F. (2016). Activité antibactérienne de l'huile essentielle de la sciure du bois de loupe de *Tetraclinis articulata* (Vahl) master du Maroc sur des souches d'origine clinique. *International Journal of Innovation and Applied Studies*. 16(2) : 314-321.

Amara N., Boughérara Y. (2017). Activité Antimicrobienne de l'Huile Essentielle du Cyprès Vert (*Cupressus Sempervirens* L.). *Algerian Journal of Natural Products*. 5(2) : 455 - 462.

Amarti F., Satrani B., Ghanmi M., Farah A., Aafi A., Aarab L., El Ajjouri M., Chaouch A. (2010). Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. du Maroc. *Biotechnologie, Agronomie, Société et environnement*. 14(1) : 141-148

Arbez M., Lacaze J.F. (1987). Les ressources génétiques forestières en France. Bureau des Ressources Génétiques. Edition INRA, Paris.

Attrassi K., Benkirane R., Attarassi B., Douira A. (2008). Développement de la pourriture des pommes en conservation en présence de sels de calcium. *Cahiers Agricultures*. 5 : 465-471.

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.

Bakkali A.A., El Amrani A., Zantar S., Toukour I. (2018). Activité Acaricide Des Huiles Essentielles Du *Mentha Pulegium*, *Origanum Compactum* Et *Thymus Capitatus* Sur L'acarien Phytophage *Tetranychus Urticae* Koch (Acari : Tetranychidae). *European Scientific Journal*. 3 : 1857-7881.

Bakkali F., Averbek S., Averbek D., Idaomar M. (2008). Biological effects of essential oils - A review. *Food Chemistry Toxicology*. 46 : 446-475.

Bardeau F. (2009). Les huiles essentielles, propriété et utilisation de l'aromathérapie. Edition François-Xavier Sorlot, Paris.

Bekhechi C., Atik-Bekkara F., Abdelouahid D.E. (2008). Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* d'Algérie. *Phytothérapie*. 6 : 153-159.

Belakhdar J. (2001). La pharmacopée Marocaine traditionnelle. Médecine arabe ancienne et Savoirs populaires. Ibis Press, Paris.

Belhadj S.F.K., Slim B.A., Aouni M., Harzallah S.F., Mahdjoub M.A., Mighri Z., 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.

Belkamel A., Bammi J., Abdelfettah B. et Douira A. (2013). Étude de la composition chimique de l'huile essentielle d'une endémique Ibéro-marocaine : *Origanum compactum* (Benth.). *Journal of Animal & Plant Sciences*. 1: 2880-2887.

Bencheqroun H., Ghanmi M., Satrani B., Aafi A., Chaouch A. (2012). Activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Artemisia mesatlantica*, plante endémique du Maroc. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*. 81 : 4-21.

Bessah R. et El-Hadi B. (2015). La filière des huiles essentielles Etat de l'art, impacts et enjeux socioéconomiques. *Revue des Energies Renouvelables*. 18 : 513-528.

Billerbeck V.G. (2007). Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. *Phytothérapie*. 5 : 249–253

Bonnet R., Caron F., Cavallo J.D., Chardon H., Chidiac C., Courvalin P., Drugeon H., Dubreuil L., Jarlier V., Jehl F., Lambert T., Leclercq R., Nicolas-Chanoine M.H., Plesiat P., Ploy M.C., Quentin C., Soussy C.J., Varon E., Weber P. (2012). Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CASFM) sur : <http://www.sfm-microbiologie.org/>.

Bouhdid S., Abrini J., Zhiri A., Espunsa M.J., Manresa A. (2009). Investigation of functional and morphological changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *O. compactum* essential oil. *Journal of Applied Microbiology*. 106: 1558-1568.

Bouhdid S., Skali S.N., Idaomar M., Zhiri A., Baudoux., Amensour., M., Abrini J. (2008). Antibacterial and antioxidant activities of *Origanum compactum* essential oil. *African Journal of Biotechnology*. 7 : 1563-1570.

Boukhobza F., GOETZ P. (2014). Phytothérapie en odontologie. 2^{ème} édition, initiatives santé.

Boullard B. (2006). Plantes et arbres remarquables des rues, squares et jardins de Rouen: Itinéraires d'un amoureux de la nature. France Amazon.

Bouyahya A., Abrini J., Bakri Y., Dakka N. (2016) a. Les huiles essentielles comme agents anticancéreux : actualité sur le mode d'action. *Lavoisier SAS*. DOI :10.1007/s10298-016-1058-z.

Bouyahya A., Jamal A., Edaoudi F., Et-Touys A., Bakri Y., Dakka N. (2016) b. *Origanum compactum* Benth : A Review on Phytochemistry and Pharmacological Properties. *Medicinal & Aromatic Plants*. DOI: 10.4172/2167-0412.1000252.

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

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

Bruneton J. (1993). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3^e édition, Edition Technique et documentation, Paris.

Bruneton J. (2009). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 4^e édition, Edition Technique et documentation, Paris.

Buckle J. (1997). Clinical aromatherapy, essential oils in practice. 2^{ème} édition, United States of America.

Burt S. (2004). Essential Oils: Their Antibacterial Properties and Potential Applications in Foods. *International Journal of Food Microbiology*. 94 : 223-253.

Castioni P., Christen P., Veuthey J.L. (1995). Extraction en phase supercritique des substances d'origine végétale. *Analusis*. 3 : 95-106.

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

Chafai A., Boukil A., Bachar M., Driss L., Guermal A., Aafi A. (2014). Manuel des bonnes pratiques de collecte de l'origan « *Origanum compactum* ». *Projet Plantes Médicinales et Aromatiques*. 3-10.

Chebaibi A., Marouf Z., Rhazi-Filali F., Fahim M., Ed-Dra A. (2016). Évaluation du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de sept plantes médicinales récoltées au Maroc. *Phytothérapie*. 14 : 355-362

Couic-Marinier F., Lobstein A. (2013). Composition chimique des huiles essentielles. *Actualités pharmaceutique*. 525(52) : 22-25.

Daouk R. K., Dagher S.M., Sattout E.J. (1995). Antifungal activity of the essential oil of *Origanum syriacum* L. *Journal of Food Protection*. 58 : 1147-1149.

Das K., Tiwari R. K.S., Shrivastava D.K. (2010). Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agents: current methods and future trends. *Journal of medicinal plants research*. 4 : 104-111.

De Sousa A.C., Alviano D.S., Blank AF., Alves P.B., Aliano C.S., Gattass C.R. (2004). *Melissa officinalis* L. essential oil: antitumoral and antioxidant activities. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 56 : 677-681.

Degryse A.C., Delpla I., Voinier M.A. (2008). Risques et bénéfices possibles des huiles essentielles. *Atelier Santé Environnement. Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique (EHESP)*.

Delarras C. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Edition Technique et documentation, Lavoisier, Paris.

Djabou N., Lorenzi V., Guinoiseau E., Andreani S., Giuliani MC., Desjobert JM., Bolla JM., Costa J., Berti L., Luciani A., Muselli A. (2013). Phytochemical composition of *Corsican Teucrium* essential oils and antibacterial activity against food borne or toxii infectious pathogens. *Food Control*. 30 : 354-363.

Djennan D., Sanchez-Escalante A., Torresco G., Beltran J.A., Roncales P. (2003). Combined Effect of Modified Atmosphere Packaging and Addition of Lycopene Rich Tomato Pulp, Oregano and Ascorbic Acid and Their Mixtures on the Stability of Beef Patties. *Food Science and Technology International*. DOI: 10.1177/108201303033883.

Duraffourd C., Lapraz J.C. (2002). Traité de phytothérapie clinique, endobiogénie et médecine. Edition Elsevier Masson.

Duval L. (2012). Les huiles essentielles à l'officine, Thèse de Doctorat en Pharmacie, UFR de médecine – pharmacie de Rouen, France.

Eberhard T., Robert A., Annelise L. (2005). Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles. Edition. Lavoisier, Paris.

El Malki F., Eddaraji K., Alloudane R., Greche H., Essalmani H., Barrijal S. (2018). Antimicrobial activity of essential oils extracted from leaves of native Moroccan plants against clinical bacterial isolates. *The International Arabic Journal of Antimicrobial Agents*. 8 : 2174-9094.

Fadel F., Hmamou B.D., Salghi R., Chebli B., Benali O., Zarrouk A., Ebenso E. E., Chakir A., Hammouti B. (2013). Antifungal Activity and Anti-Corrosion Inhibition of

Origanum Compactum Extracts. *International Journal of ELECTROCHEMICAL*. 8 : 11019 - 11032 .

Fidah A. (2016). Etude de la durabilité naturelle des bois de *Cedrus atlantica* (manetti) et de *Tetraclinis articulata* masters et évaluation de la bioactivité de leurs huiles essentielles sur les champignons basidiomycetes Lignivores. Thèse de doctorat, Université Mohamed de Rabat, Maroc.

Freeman L., Carel Y. (2006). Aromathérapie. *NUTRA NEWS* Science, Nutrition, Prévention et Santé. [http:// www. nutranews.org](http://www.nutranews.org)

Ghafouri R., Strani B., Zair T., Ghanmi M., Aafi A., El Omari M., Bentayeb A. (2014). Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of the *Cedrus atlantica* Manettiex Carrière seeds essential oil. *Mediterranean Journal of Chemistry*. 3(5): 1027-1036.

Goni P., Lopez P., Sanchez C., Gómez-Lus R., Becerril R., Nerin C. (2009). Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils . *Food Chemistry*. 116 : 982-989.

Habbadi K., Meyer T., Vial L., Gaillard V., Benkirane R., Benbouazza A., Kerzaon I., Achbani E., Lavire C. (2017). Essential oils of *Origanum compactum* and *Thymus vulgaris* exert a protective effect against the phytopathogen *Allorhizobium vitis* . *Environmental Science and Pollution Research*. DOI:10.1007/s11356-017-1008-9.

Haddouchi F., Zerhouni K., Sidi-Yekhelef A., Chaouche T.M. (2016). Évaluation de l'activité antimicrobienne de différents extraits d'*Helichrysum stoechas* subsp. *Rupestre*. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*. 85 : 152 – 159.

Jouault S. (2012). La qualité des huiles essentielles et son influence sur leur efficacité et sur leur toxicité. Thèse de doctorat, université de Lorraine, Nancy.

Kaloustia J., Hadji-Minaglou H.F. (2012). La connaissance des huiles essentielles : qualilogie et aromathérapie. Edition Lavoisier Technique et documentation.

Khaoula H., Meyer T., Vial L., Gaillard V., Benkirane R., Benbouazzal A., Achbani E., Lavire C. (2017). Essential oils of *Origanum compactum* and *Thymus vulgaris* exert a protective effect against the phytopathogen *Allorhizobium vitis*. *Environmental Science and Pollution Research*. 10 : 1007-1009.

Kheyar N., Meridja D., Belhamel K. (2014). Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Inula viscosa*, *Salvia officinalis* et *Laurus nobilis* de la région de Bejaia. *Algerian Journal of Natural Products*. 2 : 18-26.

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.

Koziol N. (2015). Huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus*, d'*Eucalyptus radiata* et de *Corymbia citriodora* : qualité, efficacité et toxicité. Thèse de doctorat, Université de Lorraine, France.

Laghchimi A., Znini M., Majidi L., Renucci F., El Harrak A., Costa J.(2014). Composition chimique et effet des phases liquide et vapeur de l'huile essentielle de *Lavandula multifida* sur la croissance mycélienne des moisissures responsables de la pourriture de la pomme (Chemical composition and effect of liquid and vapor phase of *Lavandula multifida* essential oil on mycelial growth of fungi responsible for the rot of apple). *Journal of Materials and Environmental Science*. 5 (6) : 1770-1780.

Lahlou M. (2004). Methods to Study the Phytochemistry and Bioactivity of Essential Oils. *phytotherapy research*. 18 : 435–448.

LAIB I. (2012). Etude des activités antioxydante et antifongique de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis* : application aux moisissures des légumes secs. *Nature et Technologie*. 7 : 44-52.

Lambert R.J.W., Skandamis P.N., Coote P., Nychas G.J.E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*. 91: 453-462.

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, 72p.

M'hirit A., benzyane M. (2006). Le cèdre de l'Atlas : mémoire du temps. Ed Mardaga , Casablanca.

Mahfouf N., Bennadja S., Nasri H., Djahoudi A., Heni S. (2017). Antioxidant and Antibacterial Activities of the Essential Oil of *Origanum vulgare* L. Against *Escherichia coli* Strains. *Researchgate*. 5 : 1391-1399

Manohar V., Ingram C., Gray J., Talpur N.A., Echard B.W., Bagchi D., Preuss H.G. (2001). Antifungal activities of *Origanum* oil against *Candida albicans*. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 228 : 111-117.

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.

Mbarek L.A., Mouse H.A., Elabbadi N., Bensalah M., Gamouh A., Aboufatima R., Benharref A., Chait A., Kamal M., Dalal A., Zyad A. (2007). Anti-tumor properties of blackseed (*Nigella sativa* L.) extracts. *Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research*. 40 : 839-847.

Minaglou H.F., kaloustian .J. (2012). La connaissance des huiles essentielles : Qualitologie et aromathérapie. Edition Springer-verlag, Paris.

Mnayer D. (2014). Eco-Extraction des huiles essentielles et des arômes alimentaires en vue d'une application comme agents antioxydants et antimicrobiens. Thèse de doctorat, université d'Avignon, France.

Ouis N. (2015). Étude chimique et biologique des huiles essentielles de coriandre, de fenouil et de persil. Thèse de doctorat, université d'Oron, Algérie.

Ourainl D., Agouml A., Alaoul I., Alaoul K., Cherrah Y., Amrani M., Belabbas A. (2005). Étude de l'activité des huiles essentielles de plantes aromatiques à propriétés

antifongiques sur les différentes étapes du développement des dermatophytes. *Phytothérapie*. 4 : 147-157.

Padrini F., Lucheroni M.T. (1997). Huiles essentielles pour retrouver la vitalité, le bien-être, la beauté. Edition VECCHI S.A, Paris.

Padrini F., Lucheroni M.T. (2003). Le grand livre des Huiles Essentielles. Edition VECCHIS, Paris.

Pellerin P. (2000). Techniques d'extraction des huiles essentielles. Actes de la journée de réflexion sur les plantes aromatiques et médicinales. *Annales de la Recherche Forestière au Maroc*. 27 : 74-103.

Penalver P., Huerta B., Borge C., Astorga R., Romero R., Perea A. (2005). Antimicrobial activity of five essential oils against origin strains of the Enterobacteriaceae family. *APMIS*. 113(1) : 1-6.

Pierron C. (2014). Les huiles essentielles et leurs expérimentations dans les services hospitaliers de France : exemples d'applications en gériatrie gérontologie et soins palliatifs. Thèse de doctorat, Université de Lorraine, France.

Rasooli I., Rezaei M.B., Allameh A. (2006). Ultra structural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*. *International Journal Infectious Diseases*. 10(3) : 236–241.

Rosato A., Vitali C., De Laurentis N., Armenise D., Milillo M. (2007). Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin. *Phytomedicine*. 14 : 727-732.

Russo M., Suraci F., Postorino S., Serra D., Roccotelli A., Agosteo G. (2013). Essential oil chemical composition and antifungal effects on *Sclerotium cepivorum* of *Thymus capitatus* wild populations from Calabria, southern Italy. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 23(2) : 239-248.

Salhi N., Goumni Z., Salhi A., Mehani M., Terzi V. (2015). Evaluation de l'activité antifongique *in vitro* des huiles essentielles de *Laurus Nobilis* L. sur la croissance mycélienne de *Fusarium Sporotrichoide*. *ElWahat pour les Recherches et les Etudes*. 2 : 34–44

Sangwan N.S., Farooqi A.H.A., Shabih F., Sangwan R.S. (2001). Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation*. 34: 3-21.

Satrani B., Aberchane M., Farah A., Chaouch A., Talbi M. (2006). Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles extraites par hydrodistillation fractionnée du bois de *Cedrus atlantica* Manetti. *Acta Botanica Gallica*. 153: 97-104.

Serrano M.A., Martinez R.D., Guillein F., Valverde J.M., Zapata P.J., Castillo S., Valero D. (2008). The addition of essential oils to MAPas a tool to maintain the overall quality of fruits. *Trends in Food Science & Technology*. 19 : 464-471.

Shirner M. (2001). Huiles essentielles. Description et utilisation de plus de 200 huiles essentielles et huiles végétales. 1ère édition, Gy Trédaniel Editeur, Paris.

Singh P., Srivastava B., Kumar A., Kumar R., Dubey NK., Gupta R. (2008). Assessment of *Pelargonium graveolens* oil as plant-based antimicrobial and aflatoxin suppressor in food preservation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 88 : 2421–2425.

Soualeh N., Soulimani R. (2016). Huiles essentielles et composés organiques volatils, rôles et intérêts. *Phytothérapie*. 14 : 44-57.

Thormar H. (2011). Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents. *JohnWiley & Sons, Ltd. United Kingdom*. 334p.

Ultee A., Bennik M.H.J., Moezelaar R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(8): 1561-1568.

Walsh S.E., Maillard J.Y., Russell A.D., Catrenich C.E., Charbonneau D.L., Bartolo R.G. (2003). Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and negative bacteria. *Journal of applied microbiology*. 94(2) : 240-247.

Wan J., Wilcock A., Coventry M.J. (1998). The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Applied Microbiology*. 84 : 152-158.

Zhiri A. (2006). Les huiles essentielles, un pouvoir antimicrobien avéré. *Nutra news : science, nutrition, prévention et santé*. www.nutranews.org.

Annexe

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

Infusion de viande.....2g

Hydrolysate acide de caséine..... 17,5g

Agar agar bactériologique..... 17g

Amidon soluble.....1,5g

pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C =7,3 ± 0,2.

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 5g
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 15g
Extrait de viande 3g
Extrait de levure 3g
Lactose 12g
Salicine 2g
Saccharose 12g
Chlorure de soduim 5g
Thiosulfate de soduim 5g
Citrates 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 Sabouraud

Eau distillée 1000ml
Peptone10g
Glucose20g
Agar-agar15g
pH=6.3
Stérilisation à 120°C/ 15 min

Gélose dextrose à la pomme de terre (PDA)

Eau distillée.....1000ml
Filtrat de pomme de terre.....200g
Dextrose.....15g
Agar.....20g
pH= 4.5
Stérilisation à 120°C/ 15 min

Résumé

Les huiles essentielles possèdent d'importantes activités antimicrobiennes et peuvent se substituer avec succès aux antibiotiques qui montrent leurs inefficacités à l'encontre des microorganismes résistants, ce qui nous a conduit à tester l'activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Origanum compactum* (origan compact) et *Cedrus atlantica* (cèdre) par la méthode de diffusion sur milieu gélosé vis-à-vis des souches de références et cliniques. Les résultats expérimentaux révèlent que l'huile d'origan possède un pouvoir antibactérien puissant vis-à-vis les souches : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 10876 ainsi que *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* cliniques ; et un pouvoir antifongique *in vitro* et *in vivo* intéressant vis-à-vis de *Candida albicans* et *Aspergillus niger*. L'inhibition de la croissance varie en fonction de l'espèce microbienne. En revanche, l'huile essentielle du cèdre n'a pas une efficacité antibactérienne ni antifongique où les diamètres des zones d'inhibition sont trop faibles (jusqu'à ne rien obtenir). L'huile essentielle d'origan est considérée comme étant de bon agent antifongique, de ce fait, une application de ce dernier sur des fruits de pomme altéré par *Aspergillus niger* est effectuée par deux méthodes : par contact direct et par micro-atmosphère dont les résultats obtenus ont montré que cette huile a manifesté une forte activité anti-*Aspergillus niger*.

Mots clés : Activité antibactérienne, Activité antifongique, Antibiorésistance, *Cedrus atlantica*, Huile essentielle, *Origanum compactum*.

Abstract

Essential oils have important antimicrobial activities and can successfully replace antibiotics that show their inefficiencies against resistant microorganisms, which has led us to test the antimicrobial activity of essential oils of *Origanum compactum* (compact oregano).) and *Cedrus atlantica* (cedar) by the diffusion method on agar medium against the reference and clinical strains. Experimental results reveal that Oregano oil has a potent antibacterial effect against strains: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 10876 as well as clinical *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, and antifungal power *in vitro* and *in vivo* interesting with respect to *Candida albicans* and *Aspergillus niger*. Inhibition of growth varies depending on the microbial species. In contrast, the essential oil of cedar does not have an antibacterial or antifungal efficacy where the diameters of the zones of inhibition are too weak (until nothing is obtained). The essential oil of oregano is considered as a good antifungal agent, therefore, an application of the latter on apple fruit altered by *Aspergillus niger* is carried out by two methods: by direct contact and by micro-atmosphere whose Results obtained showed that this oil exhibited strong anti-*Aspergillus niger* activity.

Key words : Antibacterial activity, Antifungal activity, Antimicrobial resistance, *Cedrus atlantica*, Essential oil, *Origanum compactum*.