

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

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



MEMOIRE

DE FIN D'ETUDES

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE MASTER

Filière : Biologie

SPECIALITE : Microbiologie appliquée

Thème

**Evaluation de l'activité antimicrobienne des huiles
essentielles de *Cedrus atlantica* et *Origanum compactum* :
application sur la tomate**

Présenté par:

M^{lle} Sarni Tinhinane

M^{lle} Yelles Dyhia

Devant le jury :

M ^r DJENANE D.	Professeur	UMMTO	PRESIDENT
M ^r OUELHADJ A.	Maitre de conférences A	UMMTO	PROMOTEUR
M ^r MOUALEK I.	Maitre-assistant	UMMTO	EXAMINATEUR
M ^{me} BENAZOUZ K.	Maitre assistante	UMMTO	EXAMINATRICE

Année universitaire 2016/2017

Dédicaces

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

A mes frères Massi, Tikinas et ma sœurs Messad.

A mon oncle Merzouk.

A mes grands-parents.

A toute ma famille.

A mes amis en particulier Hamida, Salim, Dyhia.

Dyhia

Résumé

L'ensemble des résultats obtenus au cours de notre étude ont révélé une faible activité antibactérienne de l'huile essentielle *Cedrus atlantica* vis-à-vis des souches testées à savoir *A. baumannii*, *S. aureus*, *K.pneumoniae* et *P. aeruginosa* (ATCC 27853). Par contre l'huile essentielle d'*Origanum compactum* a montré une efficacité contre toutes les souches bactériennes testées avec des zones d'inhibition allant de 17,5 à 28,5 mm.

Les bactéries Gram + sont plus sensible par rapport aux bactéries Gram-, à l'exception de l'*A. baumannii* qui est une bactérie Gram – et a montré une grande sensibilité.

L'étude de l'activité antifongique de l'huile essentielle d'*Origanum compactum* contre *Botrytis cinerea* a enregistré un pourcentage d'inhibition de 86,56% après quatre jours d'incubation. De ce fait, cette huile essentielle a été inoculée expérimentalement sur les tomates pour une évaluation *in vivo* de cette activité antifongique. Les résultats obtenus ont montré que cette huile peut être une alternative pour les conservateurs alimentaires synthétiques.

Mots clés : huiles essentielles, *Cedrus atlantica*, *Origanum compactum*, *Botrytis cinerea*, activité antibactérienne, activité antifongique.

Abstract :

All the results obtained in our study revealed a weak antibacterial activity of the essential oil *Cidrus atlantica* with the tested strains namely *A. baumannii*, *S. aureus*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* (ATCC 27853). However the essential oil of *Origanum compactum* showed effectiveness against all bacterial strains tested with zones of inhibition ranging from 17.5 to 28.5 mm.

Gram positive bacteria are more sensitive compared to Gram negative bacteria, with the exception of the *A. baumannii* which is a Gram negative bacteria, and has shown great sensitivity.

The study of the antifungal activity of the essential oil of *Origanum compactum* against *Botrytis cinerea* recorded a percentage of inhibition of 86,56% after four days of incubation. As a result, this essential oil has been inoculated experimentally on the tomatoes to assess this antifungal activity in vivo. The results obtained showed that this oil can be an alternative for the synthetic food conservatives.

Keywords : essential oils, *Cedrus atlantica*, *Origanum compactum*, *Botrytis cinerea*, antibacterial activity, antifungal activity.

Liste des figures

Figure 1. Procédé d'extraction des Huiles essentielles par distillation et entraînement à la vapeur d'eau	5
Figure 2. Procédé d'hydro-distillation.....	6
Figure 3. Les différents modes d'acquisition des gènes de résistance (R) aux antibiotiques chez les bactéries	14
Figure 4. Mécanismes de résistance aux antibiotiques	15
Figure 5. Mécanisme d'inactivation enzymatique de l'antibiotique	16
Figure 6. Schéma des parois bactériennes des bactéries à Gram négatif et des bactéries à Gram positif	17
Figure 7. Illustration schématique des principales pompes bactériennes d'efflux.....	19
Figure 8. Témoins négatifs réalisés avec le DMSO	37
Figure 9. Témoins positifs réalisé avec les antibiotiques	38
Figure 10. Représentation graphique du test de sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis des quatre antibiotiques.....	39
Figure 11. Effet de l'huile essentielle <i>Cedrus atlantica</i> sur les bactéries étudiées	40
Figure 12. Effet de l'H.E <i>Origanum compactum</i> sur les bactéries étudiées.....	41
Figure 13. Représentation graphique des résultats de l'activité antibactérienne des huiles essentielles <i>Cedrus atlantica</i> et <i>Origanum compactum</i> sur les quatre souches bactériennes étudiées.....	42
Figure 14. Résultat de la CMI réalisé avec l'H.E <i>Origanum compactum</i> sur <i>A. baumannii</i> ..	48
Figure 15. Résultat de la CMI réalisé avec l'H.E <i>Origanum compactum</i> sur <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853).....	48
Figure 16. Résultats de l'action inhibitrice de l'H.E <i>Origanum compactum</i> sur les souches (<i>A. baumannii</i> et <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853)	49

Figure 17. Résultats de culture du champignon <i>B.cinerea</i> après 4 jours d'incubation.....	51
Figure 18. Résultats de l'effet fongistatique de 15µ l de après 4 jours d'incubation à 25°C ..	51
Figure 19. Effet inhibiteur d'huile essentielle d' <i>Oréganum compactum</i> à différentes concentrations, vis-à-vis de la croissance mycélienne de <i>Botrytis cenerea</i> , après 9 jours d'incubation à 25°C.....	52
Figure 20. Croissance mycélienne de <i>B .cinerea</i> en fonction du nombre de jours d'incubation et de la concentration de l'huile essentielle d' <i>Origanum compactum</i> , comparée aux témoins	53
Figure 21. Effet inhibiteur d'huile essentielle d' <i>Origanum compactum</i> par contact indirect, vis-à-vis de la croissance mycélienne de <i>Botrytis cenerea</i> , après 9 jours d'incubation à 25°C	54
Figure 22 : Croissance mycélienne de <i>Botrytis cinerea</i> en fonction du nombre de jours.....	55
Figure 23 : Résultats de l'application de l'huile essentielle d' <i>Origanum compactum</i> sur la tomate par contacte indirect, après 15 jours d'incubation à 4°C.....	59

Liste des tableaux

Tableau I : Tableau descriptif des différentes souches utilisées dans notre étude.....	28
Tableau II : Antibiogramme réalisé sur l' <i>A. baumannii</i> au niveau du CHU de T-O	28
Tableau III : Antibiogramme réalisé sur <i>S.aureus</i> au niveau du CHU de Tizi-Ouzou	29
Tableau IV : Antibiogramme réalisé sur <i>S.aureus</i> au niveau du CHU de Tizi-Ouzou.....	29
Tableau V : Tableau descriptif des deux huiles essentielles utilisées dans notre étude.....	30
Tableau VI : Valeurs des dilutions utilisées dans la concentration minimale inhibitrice.....	34
Tableau VII : Caractères morphologiques étudiés pour la vérification des souches testées ..	37
Tableau VIII : Résultats des diamètres des zones d'inhibition en mm (moyenne $\pm$ l'écart type) des antibiotiques sur les quatre souches bactériennes.....	38
Tableau IX : Résultats des diamètres des zones d'inhibition en mm (moyenne $\pm$ l'écart type) de l'H.E de <i>Cedrus atlantica</i> sur les quatre souches bactériennes.....	40
Tableau X : Résultats des diamètres des zones d'inhibition en mm (moyenne $\pm$ l'écart type) de l'H.E <i>Origanum compactum</i> sur les quatre souches bactériennes	41
Tableau XI : Tableau récapitulatif de l'activité antibactérienne des huiles essentielles <i>Cedrus atlantica</i> et <i>Origanum compactum</i> sur les quatre souches bactériennes	42
Tableau XII : Valeur des CMI de <i>Origanum compactum</i> des deux souches testées (μ l/ml) .	49
Tableau XIII : Activité antifongique de l'H.E d' <i>Origanum compactum</i> sur <i>Botrytis cinerea</i> par la méthode de contact direct exprimée par la croissance mycélienne en mm (moyenne $\pm$ l'écart type)	53
Tableau XIV : Activité antifongique de l'H.E d' <i>Origanum compactum</i> sur <i>Botrytis cinerea</i> par la méthode de contact indirect exprimée par la croissance mycélienne en mm (moyenne $\pm$ l'écart type).....	54
Tableau XV : Les indices antifongique de l'huile essentielle <i>Origanum compactum</i>	55

Liste des abréviations

ATB	Antibiotique
BHIB	Brain Heart Infusion Borth ou (Bouillon cœur cerveau)
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CEPCM	Centre Européen de prévention et contrôle de maladie
DMSO	Dimethylsulfoxyde
DO	Densité Optique
g	gramme
GC/MS	Chromatographie en phase Gazeuse-Spectrométrie de Masse
h	heure
IA	Indice Antifongique
MHA	Muller Hinton Agar
mg	milligramme
mm	millimètre
nm	nanomètre
NARMS	National Antimicrobial Resistance Monitoring Système ou (Le Système national de surveillance de la résistance aux antimicrobiens)
NMR	Nuclear Magnetic Resonance ou (Résonance magnétique nucléaire)
OILB	Organisation Internationale de la lutte biologique
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ph	Potentiel d'hydrogène
UFC	Unité Formant Colonie
µl	microlitre
vnr	valeur nutritionnelle relative
V/V	Volume/Volume

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction 1

Première partie : Synthèse bibliographique

Chapitre 1. Les huiles essentielles

I. Définition 3

II. Localisation des huiles essentielles dans la plante 3

III. Critères de qualité..... 3

III.1. L'espèce botanique..... 4

III.2. L'organe producteur 4

III.3. L'origine géographique 4

III.4. Le mode de culture 4

III.5. Chémotype 4

IV. Méthodes d'extraction des huiles essentielles 4

IV.1. Extraction par expression à froid 5

IV.2. Extraction par distillation et entraînement à la vapeur d'eau..... 5

IV.3. Hydro-distillation ou distillation à l'eau 6

IV.4. Extraction par les solvants organiques 6

IV.5. Extraction par le CO₂ 7

V. Analyses des huiles essentielles 7

VI. Propriétés physico-chimique 8

Chapitre 2. Les propriétés des huiles essentielles

I. Les principales propriétés des huiles essentielles 9

I.1. Activités anti-infectieuses 9

I.1.1. Activités antibactériennes	9
I.1.2. Activités antifongiques	10
I.1.3. Activités antivirales	10
I.1.4. Activités antiseptiques	10
I.2. Activités anti-inflammatoires.....	10
I.3. Régulatrices du système nerveux.....	11
I.3.1. Antispasmodiques	11
I.3.2. Calments, antxiolytiques.....	11
I.3.3. Analgésiques, antalgiques.....	11
I.4. Drainantes respiratoires	12
I.4.1. Expectorantes	12
I.4.2. Fluidifiantes	12
I.5. Digestives.....	12
I.6. Cicatrisantes.....	12

Chapitre 3. La résistance microbienne

I. Résistance aux antibiotiques	13
I.1. Définition de la résistance.....	13
I.2. Type de résistance	13
I.2.1. Résistance naturelle.....	13
I.2.2. Résistance acquise	13
I.2.2.1. Résistance par mutation chromosomique	13
I.2.2.2. Résistance par acquisition de gènes	14
I.3. Mécanisme de résistance.....	15
I.3.1. Inactivation enzymatique de l'antibiotique.....	16
I.3.2. Diminution de la quantité de l'antibiotique atteignant la cible	16
I.3.2.1. Par baisse de perméabilité membranaire.....	16
I.3.2.2. Par système d'efflux	19

I.3.3. Altération des cibles cellulaires des antibiotiques	19
I.3.4. Protection de la cible.....	19
I.4. Evolution rapide de la résistance aux antibiotiques	19
II. Résistance des champignons	20
II.1. Définition.....	20
II.2. Types de résistance aux antifongiques	20
II.2.1. Résistance intrinsèque	20
II.2.2. Résistance acquise	21
II.3. les mécanismes de résistance.....	21
II.3.1. Production des gènes responsables de la résistance	21
II.3.2. Capacité à former les biofilms	22

Chapitre 4. Lutte contre la résistance microbienne

I. Lutte contre la résistance bactérienne	23
I.1. Les différentes politiques européennes et internationales.....	23
I.1.1. En Europe.....	23
I.1.2. Au niveau international.....	24
II. Lutte contre la résistance fongique	25
II.1. Stratégies de protection des plantes contre <i>Botrytis cinerea</i>	25
II.2. Lutte chimique	25
II.3. Prophylaxie	26
II.4. Protection biologique	26

Deuxième partie : Etude expérimentale

Matériels et méthodes

I. Matériels	28
I.1. Les souches bactériennes testées	28
I.1.1. <i>Acinetobacter baumannii</i>	28

I.1.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	29
I.1.3. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	29
I.1.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	30
I.2. Le champignon (<i>Botrytis cinerea</i>)	30
I.3. Les huiles essentielles	30
I.4. L'appareillage	30
I.5. milieux de culture	30
I.6. Emulsifiant	31
I.7. Les antibiotiques	31
I.8. L'antifongique	31
II Méthodes	31
II.1. Test de confirmation des souches bactériennes	31
II.2. Préparation de l'inoculum	32
II.2.1. Préparation des pré-cultures	32
II.2.2. Préparation des suspensions bactériennes	32
II.3. L'activité antibactérienne	32
II.3.1. Test d'aromatogramme	32
II.3.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	33
II.4. Analyses statistiques	34
II.5. Champignon (<i>Botrytis cinerea</i>)	34
II.5.1. Pureté de la souche fongique	34
II.5.2. Préparation de la suspension fongique	35
II.5.3. Activité antifongique de l'huile essentielle d' <i>Origanum compactum</i>	35
II.5.3.1. Méthode par contact direct	35
II.5.3.2. Méthode par contact indirect	35
II.5.4. Application de l'huile essentielle d' <i>Origanum compactum</i> sur une matrice alimentaire	36

Résultats et discussion

I. Résultat du test de confirmation des souches bactériennes	37
II. Résultats des témoins négatifs	37
III. Résultats des témoins positifs	38
IV. Résultats de la sensibilité des souches bactériennes aux deux huiles essentielles	40
IV.1. la sensibilité des bactéries à l'huile essentielle <i>Cedrus atlantica</i>	40
IV.2. la sensibilité des bactéries à l'huile essentielle <i>Origanum compactum</i>	41
V. Résultats des concentrations minimales inhibitrices réalisées avec l'huile essentielle <i>Origanum compactum</i>	48
VI. activité antifongique de l'huile essentielle <i>Origanum compactum</i>	51
VI.1. Résultats des témoins négatifs	51
VI.2. Résultats des témoins positifs	51
VI.3. Résultats du test de sensibilité de la souche fongique <i>Botrytis cinerea</i> à l'huile essentielle d' <i>Origanum compactum</i>	52
VI.3.1. Méthode de contact direct	52
VI.3.2. Méthode de contact indirect	54
VI.4. Evaluation du pourcentage d'inhibition de l'huile essentielle <i>Origanum compactum</i> testée sur <i>Botrytis cinerea</i>	55
VI.5. résultats de l'application de l'huile essentielle <i>Origanum compactum</i> sur la matrice alimentaire	59
Conclusion et perspectives	63

Références bibliographiques

Annexes

Les substances antimicrobiennes sont des substances synthétiques ou naturelles utilisées pour détruire ou empêcher la croissance des bactéries, champignons et autres microorganismes. Ces substances ont joué un rôle considérable quant à l'amélioration de la santé des populations permettant de réduire le nombre de décès liés à des maladies et infections autrefois incurables et mortels.

On sait aujourd'hui qu'un nombre croissant de patients est infecté par des micro-organismes ayant développé une résistance à ces agents. Cette résistance aux substances antimicrobiennes est un phénomène naturel, cependant, le recours et l'utilisation excessive et incontrôlée de ces substances accélèrent ce phénomène mettant ainsi en péril les succès médicaux réalisés. Cette résistance aux substances antimicrobiennes constitue désormais une véritable menace de santé publique entraînant des périodes de traitements plus longs, plus compliquées, un plus grand risque de décès et des surcoûts pour les systèmes de santé.

Au vu de la propagation du phénomène de résistance, la découverte de nouveaux agents antimicrobiens, est devenue plus qu'indispensable. Pour être innovants et contourner les mécanismes de résistance microbienne, les antimicrobiens de demain devront viser de nouvelles « cibles » d'action chez les microorganismes. Les pistes de recherche sont nombreuses mais l'exploration des ressources naturelles apparaît comme des plus prometteuses car celles-ci constituent, de par leur biodiversité, la plus grande réserve de substances actives.

En alternative aux antimicrobiens, l'utilisation des huiles essentielles est peut-être l'avenir. En effet, les huiles essentielles sont très concentrées en principes actifs qui sont dotée de propriétés antibactériennes, antifongiques et antivirales (**KORDALI *et al.*, 2005**).

Aujourd'hui , la recherche porte sur l'utilisation des huiles essentielles comme un outil très intéressant pour augmenter la durée de conservation des denrées 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 et légumes pendant l'entreposage (**CAGNON *et al.*, 2003; SARRANO, 2008**).

Le présent travail a pour objectif d'évaluer l'activité antibactérienne et antifongique des huiles essentielles. Pour ce faire, nous nous sommes intéressé de manière approfondie au sujet,

nous avons testé les deux huiles essentielles *Cedrus atlantica* et *Origanum compactum* sur quatre bactéries multirésistante. Nous avons aussi testé la sensibilité d'un champignon phytopathogène (*Botrytis cinerea*) vis-à-vis de l'huile essentielle *Origanum compactum* *in vitro* et *in vivo*.

I. Définition

Le terme « huile essentielle » a été inventé au 16^{ème} siècle par le médecin Suisse Von HOHENHEIM pour désigner le composé actif d'un remède naturel (**BURT, 2004**). Les huiles essentielles sont des extraits volatils et odorants que l'on extrait de certains végétaux. Elles se forment dans un grand nombre de plantes comme sous-produits du métabolisme secondaire. Les huiles essentielles sont des composés liquides très complexes, elles ont des propriétés et des modes d'utilisation particuliers et ont donné naissance à une branche nouvelle de la phytothérapie : l'aromathérapie (**BINET et BRUNEL, 1968**). Les huiles essentielles sont présentes sous la forme de minuscules gouttelettes en petites quantités par rapport à la masse du végétal (**PADRINI et LUCHERONI, 2006**).

D'après **BONNAFOUS (2013)**, l'huile essentielle, au sens strict du terme, est le produit obtenu à partir de la matière première végétale par les techniques traditionnelles de distillation ou d'expression à froid. Cette définition ne comprend pas les extraits aromatiques obtenus par d'autres techniques d'extractions. L'essence est la substance aromatique sécrétée par la plante, qui par distillation devient une huile essentielle.

II. Localisation des huiles essentielles dans la plante

Les huiles essentielles sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices et s'accumulent en général dans des cellules glandulaires spécialisées, situées en surface de la cellule et recouvertes d'une cuticule. Elles sont soit stockées dans une cellule transformée en cellule à essence, ou dans des poils glandulaires, des poches sécrétrices, des canaux sécréteurs voir des papilles ; elles peuvent être transportées dans l'espace intercellulaire lorsque les poches à essence sont localisées dans les tissus internes : c'est le cas des rhizomes de fougère mâle par exemple (**EBERHARD et al., 2005**). Les huiles essentielles (H.Es) sont soustraites aux plantes par divers procédés afin de les rendre accessibles à l'homme (**SHIRNER, 2004**).

III. Critères de qualité

Selon **JOUAULT (2012)** l'H.E utilisée en thérapeutique doit posséder de nombreux critères de qualité :

III.1. L'espèce botanique

La certification botanique doit apparaître selon la nomenclature internationale sous son nom latin précisant le genre, l'espèce et la sous-espèce.

III.2. L'organe producteur

Selon la partie de la plante (feuilles, fleur, etc.) distillée (ou exprimée pour les zestes de Citrus), il peut exister plusieurs H.Es pour la même plante avec des compositions chimiques et des activités différentes.

III.3. L'origine géographique

Il y a des différences de composition chimique selon le pays d'origine. Une même plante grandissant dans des lieux différents peut produire des huiles essentielles différentes.

III.4. Le mode de culture

Il définit si la plante est cultivée ou sauvage et si elle est issue d'une culture biologique ou non. Il est souvent représenté par un label si la plante provient d'une culture biologique.

III.5. Chémotype

Il définit la molécule aromatique révélatrice des principales propriétés thérapeutiques de l'huile essentielle. Une plante de même variété botanique peut produire des huiles essentielles de compositions chimiques différentes selon son origine, son pays, son climat et son sol. Une huile essentielle peut contenir de vingt-cinq à cent molécules biochimiques différentes. Ce qui explique la polyvalence d'action des huiles essentielles.

On effectue une chromatographie en phase gazeuse liée à une spectrométrie de masse pour identifier et quantifier chacune de ces molécules et connaître ainsi la composition précise des H.Es.

IV. Méthodes d'extraction des huiles essentielles

Depuis très longtemps, l'homme s'est intéressé à trouver des techniques d'extraction des huiles essentielles dans le but de les utiliser dans plusieurs domaines, dont la médecine et la parfumerie (**PADRINI et LUCHERONI, 2006**).

L'extraction des huiles essentielles est un processus délicat et très important, son but est de capter les produits de la plante les plus subtils et les plus fragiles. De nombreux procédés sont utilisés pour l'extraction de ces substances telle que l'entraînement à la vapeur d'eau, l'extraction par solvant organique, l'hydro-distillation (SALLE, 2004). On distingue les procédés suivants :

IV.1. Extraction par expression à froid

L'extraction par expression à froid est le processus le plus simple et le plus limité, c'est une méthode artisanale qui est totalement abandonnée. Les plantes sont pressées à froid (notamment les agrumes : citron, orange, etc.) de l'écorce ou des fruits. Cette technique consiste à briser mécaniquement les poches oléifères de zestes frais d'agrumes pour libérer leur contenu aromatique (BENJILALI, 2004).

IV.2. Extraction par distillation et entraînement à la vapeur d'eau

Les huiles essentielles sont généralement obtenues par distillation et entraînement à la vapeur d'eau, cette opération s'accomplit dans un distillateur. Le matériel végétal est soumis à l'action d'un courant de vapeur sans macération préalable. Ce courant de vapeur entraîne les molécules aromatiques vers un système de refroidissement. La vapeur d'eau chargée ainsi d'essence retourne à l'état liquide par condensation. Le produit de la distillation se sépare donc en deux phases distinctes : l'huile essentielle et l'eau condensée que l'on appelle eau florale ou hydrolat (BENJILALI, 2004).

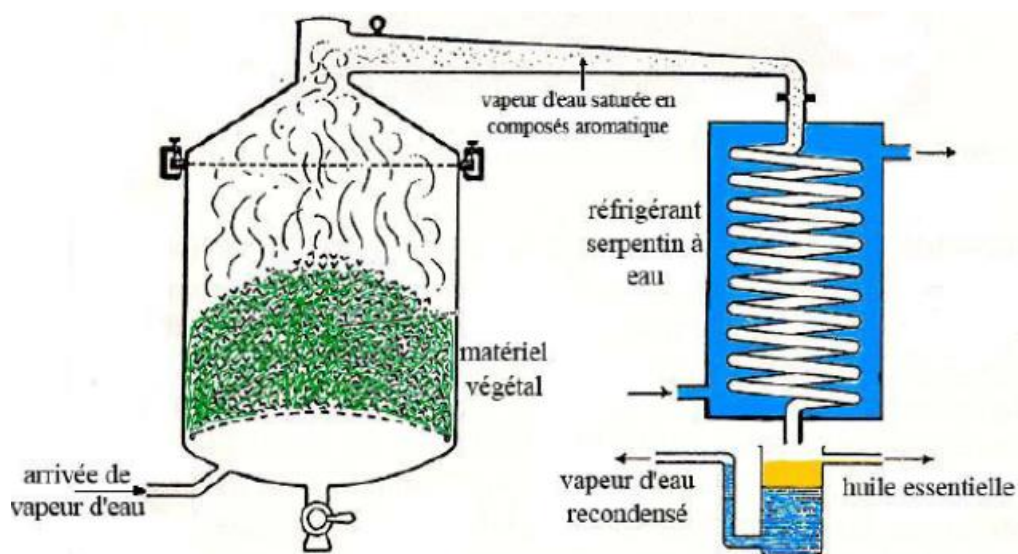


Figure 1 : Procédé d'extraction des huiles essentielles par distillation et entraînement à la vapeur d'eau (EL HAIB, 2011).

IV.3. Hydro-distillation ou distillation à l'eau

Dans cette technique le matériel végétal est en contact direct avec l'eau placé sur une source de chaleur. Les cellules végétales éclatent sous l'effet de l'ébullition et libèrent les molécules odorantes, lesquelles sont entraînées par la vapeur d'eau créée. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare de l'hydrolat par différence de densité. L'huile essentielle étant plus légère que l'eau (sauf quelques rares exceptions), elle surnage au-dessus de l'hydrolat (**BRUNETON, 1999**).



Figure 2. Dispositif d'hydrodistillation (**BOUMAZA, 2011**).

IV.4. Extraction par les solvants organiques

Cette méthode est utilisée pour les organes végétaux présentant une concentration relativement faible d'huile essentielle. Elle est basée sur le fait que les huiles essentielles sont solubles dans la plupart des solvants organiques. Un épuisement du matériel végétal est effectué à l'aide d'un solvant volatil à un point d'ébullition bas qui sera éliminé par distillation sous pression réduite. L'évaporation laisse un résidu cireux, très coloré et très aromatique appelé «concrète». Le traitement de cette concrète avec l'alcool conduit à l'absolue (**BELAICHE, 1979**).

L'extraction par les solvants est très coûteuse à cause du prix de l'équipement et la grande consommation de solvants

IV.5. Extraction par le CO₂

Cette technique se base sur la solubilité des constituants dans le CO₂ et de son état physique. Son originalité repose sur le solvant utilisé ; il s'agit du CO₂ en phase supercritique. Au-delà de son point critique (P=73,8 bars et T= 31,1°C), le CO₂, possède des propriétés intermédiaires entre celles des liquides et celles des gaz ce qui lui confère un pouvoir d'extraction, modulable à volonté en jouant sur la température et la pression (**PERON, 1992**).

Le CO₂ supercritique est un solvant idéal puisqu'il est naturel, inerte chimiquement, inflammable, non toxique, disponible et peu coûteux. Son point fort est la bonne qualité de l'extrait (**PELLERIN, 1991**).

V. Analyses des huiles essentielles

Selon la Pharmacopée française et européenne, le contrôle des huiles essentielles s'effectue par différents essais. Ce contrôle a pour but de définir les caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle comme ; la masse volumique, l'indice de réfraction, l'indice d'acide, l'indice d'ester, etc. Ces caractéristiques propres à chaque huile seront ensuite utilisées pour décrire l'huile essentielle et servir de critère de qualité. Les méthodes de détermination des caractéristiques physico-chimiques à utiliser sont décrites avec précision dans le recueil de normes publiées par l'Association Française de Normalisation (**AFNOR, 1996**), elles-mêmes identiques aux normes internationales de l'ISO (**ISO, 1997**).

Deux autres types d'analyse qui ont pour but d'identifier les différents constituants de l'huile essentielle afin d'en connaître la composition chimique: la chromatographique en phase gazeuse GC et la chromatographique en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse GC/MS. La chromatographique en phase gazeuse GC est utilisée pour l'analyse quantitative et la chromatographique en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse GC/MS pour l'analyse qualitative (**LAMARTI et al., 1993; MARRIOTT et al., 2001; LAHLOU, 2004; BOURKHISS et al., 2007**).

La GC et la GC/MS, en plus de connaître très exactement la composition chimique, elles permettent la recherche des traces de produits indésirables tels les pesticides ou les produits chimiques ajoutés (**RENATA et al., 2006 ; BASER et BUCHBAUER, 2010**). Des composés qui ne sont pas facilement séparés par GC, et les molécules structurellement semblables comme les composés stéréoisomériques d'huiles essentielles sont analysés par ¹³C-

NMR (Nuclear Magnetic Resonance), ^1H -NMR, etc. (**LAHLOU, 2004; BASER et BUCHBAUER, 2010**).

VI. Propriétés physico-chimique

Les H.Es sont odorantes, très volatiles et inflammables. Leur chimie est complexe, mais en général, elles sont un mélange de terpènes, d'alcool, d'aldéhydes, de cétones et d'esters (**PADRINI, ET LUCHERONI, 2006**). En ce qui concerne les propriétés physico-chimiques, les H.Es forment un groupe très homogène (**BERNARD *et al.*, 1988 ; BRUNETON, 1993**). Les principales caractéristiques sont :

- Liquides à température ambiante ;
- N'ont pas le toucher gras et onctueux des huiles fixes ;
- Volatiles et très rarement colorées ;
- Une densité faible pour les huiles essentielles à forte teneur en monoterpènes ;
- Un indice de réfraction variant essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé, cependant une teneur élevée en dérivés oxygénés produira l'effet inverse ;
- Solubles dans les alcools à titre alcoométrique élevé et dans la plupart des solvants organiques mais peu solubles dans l'eau ;
- Douées d'un pouvoir rotatoire puisqu'elles sont formées principalement de composés asymétriques ;
- Les H.Es s'altèrent facilement et perdent leur propriété si elles ne sont pas enfermées dans des récipients bien clos, à l'abri de l'air et de la lumière.

Les H.Es forment une tache transparente sur le papier, celle-ci disparaît rapidement car les essences végétales sont très volatiles (contrairement aux résines qui, habituellement dissoutes dans les essences, laissent un résidu visqueux ou solide après évaporation des essences). Grâce à cette propriété, les essences végétales diffusent rapidement au travers des épidermes, même au travers des cuticules épaisses et se répandent dans l'atmosphère. Ce caractère, associé à la propriété qu'ont la plupart des essences végétales de posséder une odeur très prononcée, et souvent agréable, les rend responsables de l'odeur caractéristique de nombreux végétaux odoriférants (**BINET et BRUNEL, 1968**).

I. Les principales propriétés des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont connues pour être douées de propriétés antiseptiques et antimicrobiennes. Beaucoup d'entre elles, ont des propriétés antitoxiques, antivenimeuses, antivirales, anti-oxydantes, et antiparasitaires (**VALNET, 2005**).

Les huiles essentielles contiennent plus d'une centaine de molécules aromatiques dans des proportions très variables. Ce sont ces différentes combinaisons de molécules qui donnent des propriétés si particulières aux huiles essentielles.

L'activité biologique d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique et les possibles effets synergiques entre ses composants. Sa valeur tient à son «totum» ; c'est-à-dire, l'intégralité de ses constituants et non seulement à ses composés majoritaires (**LAHLOU, 2004**).

I.1. Activités anti-infectieuses

Les huiles essentielles sont constituées de plusieurs composés volatils différents et ont montré qu'ils possèdent des propriétés antimicrobiennes et fongicides importantes (**KARMEN *et al.*, 2003**; **AHMET *et al.*, 2005**). Les H.Es et Les extraits de plantes gagnent un intérêt croissant en raison de leur Statut relativement sécurisé, leur large acceptation par les consommateurs, Et leur exploitation pour des fonctionnalités multifonctions potentielles (**SAWAMURA, 2000** ; **ORMANCEY *et al.*, 2001**). Donc, les huiles essentielles et les extraits de plantes sont l'un des groupes les plus prometteurs de composés naturels pour le développement des produits antibactériens et anti-fongiques plus sûrs.

I.1.1. Activités antibactériennes

Les huiles essentielles ont un large spectre d'action antiseptique, leur activité antimicrobienne est principalement en fonction de leur composition chimique (**MIBARKI, 2010**).

Plusieurs stratégies de protection ont été développées pour contrôler les infections bactériennes en exploitant les plantes médicinales ainsi que leurs métabolites secondaires. La croissance des bactéries peut être inhibée ou tuée par les extraits de plantes et les huiles essentielles. (**RAKOTONIRINA *et al.*, 2010**).

Selon **DAVIDSON (1997)**, les huiles essentielles exercent des actions toxiques diverses sur les bactéries, comme la perturbation de la membrane cytoplasmique, la perturbation de la force motrice de proton, fuite d'électron et la coagulation du contenu protéique des cellules.

I.1.2. Activités antifongiques

Les huiles essentielles les plus étudiées pour leurs propriétés antifongiques appartiennent à la famille des *Labiatae* : thym, origan, lavande, menthe, romarin, sauge, etc. Etant donnée la grande complexité de la composition chimique des H.Es, malgré de possibles synergies certains auteurs préfèrent étudier l'effet d'un composé isolé pour pouvoir ensuite le comparer à l'activité globale de l'huile. Ainsi l'activité fongistatique des composés aromatiques semble être liée à la présence de certaines fonctions chimiques (**VOUKOU et al., 1988**).

I.1.3. Activités antivirales

Plusieurs études (**HAMMER et al., 2006 ; KOCH et al., 2008**), prouvent l'action des huiles essentielles sur les virus.

En général, les virus sont très sensibles aux molécules aromatiques, les huiles essentielles constituent une véritable alternative pour traiter les troubles d'origine virales allant des plus banales aux plus redoutables (**FRANCHOMME et al., 2001**).

I.1.4. Activités antiseptiques

Les molécules aromatiques sont capables de détruire les germes infectieux, et de s'opposer à leur prolifération tant dans les organismes vivants que dans l'environnement (**FRANCHOMME et al., 2001**).

I.2. Activités anti-inflammatoires

Un effet anti-inflammatoire a été décrit pour les H.Es de *Protium strumosum*, *Protium lewellyni* et *Protium grandifolium* (**SIANI et al., 1999**). Des études ont montré que les H.Es de *Chromoleana odorata* et de *Mikania cordata*, donnaient des tests d'inhibition positifs sur la lipoxygénase L-1 de soja, modèle de la lipoxygénase humaine (5-LO) impliquée dans les processus de l'inflammation (**BEDI et al., 2004**). Dans une autre étude, il a été montré que l'H.E de *Chromoleana odorata* présentait des actions positives sur la fonction

Cyclooxygénase de la Prostaglandine H-synthétase (**BEDI et al, 2010**). Enfin, les mêmes auteurs ont montré que les H.Es de *Cymbopogon giganteus*, *Ocimum gratissimum* et *Eucalyptus citriodora* avaient des activités inhibitrices sur la cyclooxygénase (**BEDI et al., 2003**).

Les huiles essentielles possédant des aldéhydes ont des propriétés actives contre l'inflammation par voie interne comme l'huile essentielle de Gingembre (**PURCHON, 2001 in MAYER, 2012**).

I.3. Régulatrices du système nerveux

I.3.1. Antispasmodiques

Les huiles essentielles possédant des éthers de charge positives, possèdent une action sur les spasmes des muscles lisses ou striés comme l'huile essentielle d'Hélichryse, ou des esters porteurs de charges négatives, présentent les caractéristiques de cette classe électrique (calmantes et anti-inflammatoires). Leur action antispasmodique est plus nuancée, avec une hiérarchie d'activités permettant d'affiner la prescription selon les subtilités des tableaux cliniques (**FRANCHOMME et al., 2001**).

I.3.2. Calmantes, anxiolytiques

Plusieurs molécules présentent des propriétés du plus haut intérêt dans le but de favoriser la détente et le sommeil (**JOUAULT, 2012**).

Les aldéhydes, comme les citrals de la verveine citronnée et de la mélisse officinale, les éthers et les esters rendront souvent de bons services dans ce cadre. Certaines études signalent une activité anxiolytique et hypnotique du linalol (**ZIMMERMANN, 2012**).

I.3.3. Analgésiques, antalgiques

Les principes aromatiques et l'utilisation des huiles essentielles sont les plus indiqués dans la lutte contre la douleur. La raison de cette profusion tient à la variété des causes des phénomènes douloureux.

Les huiles essentielles les plus connues pour leur action antalgique sont les huiles essentielles d'Eucalyptus citronné, de Gingembre, de Lavande vraie.

I.4. Drainantes respiratoires (PURCHON, 2001 ; WILLEM, 2002 in MAYER, 2012)

I.4.1. Expectorantes

Les huiles essentielles riches en oxyde comme l'huile essentielle d'Eucalyptus globuleux (*Eucalyptus globulus*) ou de Romarin à cinéole (*Rosmarinus officinalis* CT cinéole) agissent sur les glandes bronchiques et sur les cils de la muqueuse bronchique.

I.4.2. Fluidifiantes

Les huiles essentielles possédant des cétones ont une action mucolytique en dissolvant les sécrétions accumulées au niveau de la muqueuse.

I.5. Digestives (PURCHON, 2001; WILLEM, 2002 in MAYER, 2012)

Diverses molécules aromatiques sont susceptibles de stimuler l'appétit, et de faciliter la digestion. Ainsi :

- le cuminal contenu par exemple dans l'huile essentielle de Cumin (*Cuminum cyminum*) stimule les glandes digestives ;
- La menthone, la carvone et la verbénone activent la circulation au niveau des voies hépatobiliaires ;
- Le menthol et le thujanol sont de bons stimulant hépatocytaires. Les phtalides quant à eux interviennent dans le cycle de détoxification hépatorénal.

I.6. Cicatrisantes

Les huiles essentielles cicatrisantes sont les huiles essentielles 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 (WILLEM, 2002).

I. Résistance aux antibiotiques

I.1. Définition de la résistance

L'antibiorésistance se définit comme la capacité d'un microorganisme à résister aux effets des antibiotiques (**LOTRIE et TRUDEL, 2003**).

Un microorganisme est considéré résistant lorsque sa concentration minimale inhibitrice (CMI) est plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce.

Elle apparaît lorsqu'un antibiotique ne parvient plus à tuer ou à inhiber la croissance d'un microorganisme (**CARLE, 2009**).

I.2. Types de résistances

I.2.1. Résistance naturelle

On parle de résistance naturelle lorsque toutes les souches d'une même espèce sont résistantes à un antibiotique. L'expression d'un caractère inné, partagé par l'ensemble de la communauté bactérienne, rend inappropriée l'utilisation de certains antibiotiques (**BRIAND, 2012**).

Elle est programmée par le génome bactérien, fixe et constante ; transmise à la descendance (transmission verticale) ; mais elle n'est pas ou peu transmissible sur un mode horizontal (**MARTINEZ et BAQUERO, 2000**).

I.2.2. Résistance acquise

La résistance bactérienne acquise à un antibiotique est un phénomène qui apparaît au niveau des souches d'une espèce donnée, normalement sensible à cet antibiotique. C'est l'acquisition d'un facteur génétique qui se traduit par une réduction de la sensibilité à la molécule qui lui était fatale. Elle peut donc se faire soit par mutation chromosomique soit par acquisition des gènes transférés d'un autre micro-organisme.

I.2.2.1. Résistance par mutation chromosomique

La résistance acquise par mutation est aussi qualifiée de résistance chromosomique. Le phénomène de mutation est conditionné par l'utilisation d'antibiotiques. Ces derniers ne sont pas agents mutagènes mais ils contribuent à sélectionner de manière spontanée, des mutants résistants au sein d'une population bactérienne, en éliminant les bactéries sensibles (**GOOSSENS *et al.*, 2006**).

La résistance chromosomique est un phénomène rare puisqu'il intervient en moyenne tous les 10⁵ à 10¹⁰ divisions de la bactérie. Elle possède un caractère aléatoire car l'antibiotique n'est pas une molécule mutagène donc n'induit pas de mutation chez la bactérie. On note aussi son caractère spécifique (affecte un antibiotique ou une famille d'antibiotiques qui ont le même mécanisme d'action) (**COURVALIN *et al.*, 2001**).

I.2.2.2. Résistance par acquisition de gènes

C'est une résistance par un gain d'ADN extra-chromosomique le plus souvent plasmidique. Le plasmide est un fragment d'ADN extra-chromosomique (présent dans le cytoplasme) et qui peut porter un ou plusieurs gènes de résistance. Ces fragments d'ADN peuvent être transmis d'une bactérie donneuse à une autre bactérie dite receveuse.

Ce mécanisme facilite l'acquisition de résistance et même de multi-résistance contrairement à celle acquise par mutation d'ADN chromosomique. Ce mode d'acquisition de résistance peut se faire selon trois mécanismes différents dont la transduction (avec un bactériophage comme vecteur), la transformation (capture d'ADN par la bactérie) et la conjugaison (transfert de plasmide d'une bactérie à une autre qui peut être d'espèce différente) (BAUDRY et BREZELLE, 2006).

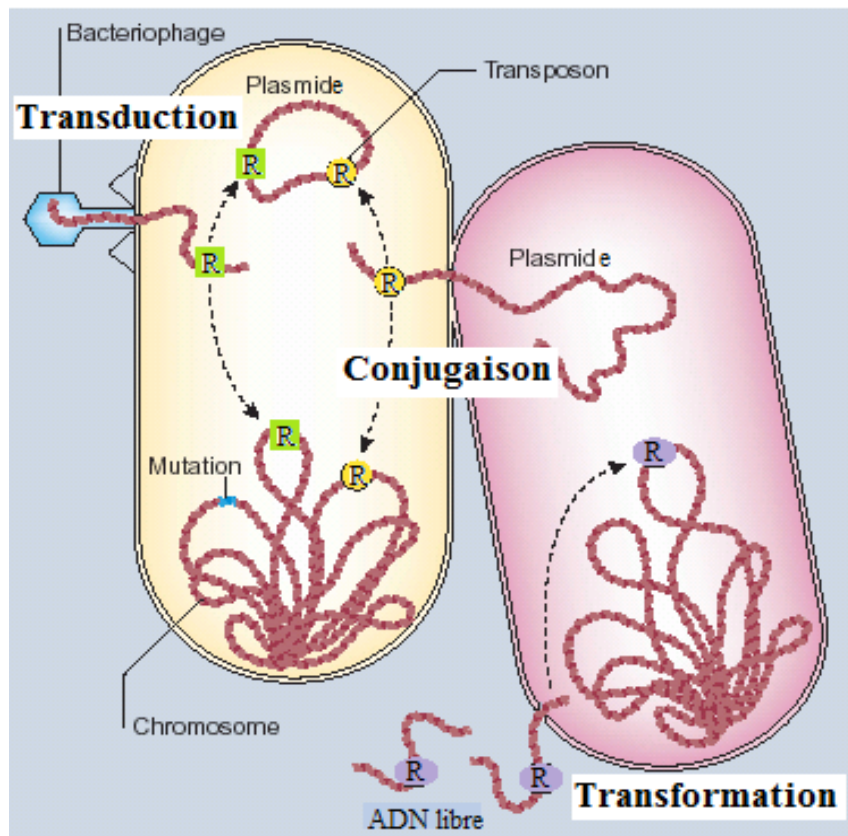


Figure 3 : Les différents modes d'acquisition des gènes de résistance (R) aux antibiotiques chez les bactéries (LEVY et MARSHALL, 2004).

Dans le cas où la résistance résulte d'une acquisition de gènes, elle est instable en l'absence de facteurs de sélection, transférable d'une bactérie à une autre appartenant parfois à des espèces différentes (MARTINEZ et BAQUERO, 2000 ; LAVIGNE *et al.*, 2009 ; COX WRIGHT, 2013). Ainsi, les souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la vancomycine (SARV) auraient acquis ce caractère suite au transfert plasmidique de l'opéron van A, réalisé par

conjugaison avec *Enterococcus faecalis* (NOBLE *et al.*, 1992 ; ALEKSHUN et LEVRY, 2007).

I.3. Mécanismes de résistance

Les bactéries ont développé différents mécanismes afin de neutraliser l'action des agents antibactériens, les plus répandus étant l'inactivation enzymatique de l'ATB, la modification de la cible, diminution de la pénétration de l'antibiotique. D'autres mécanismes tels que la protection ou la surprotection de la cible de l'ATB sont également décrits. Ils sont cependant, plus rares et sur tout associés à certaines classes de composés (GUARDASSI et COURVALIN, 2006).

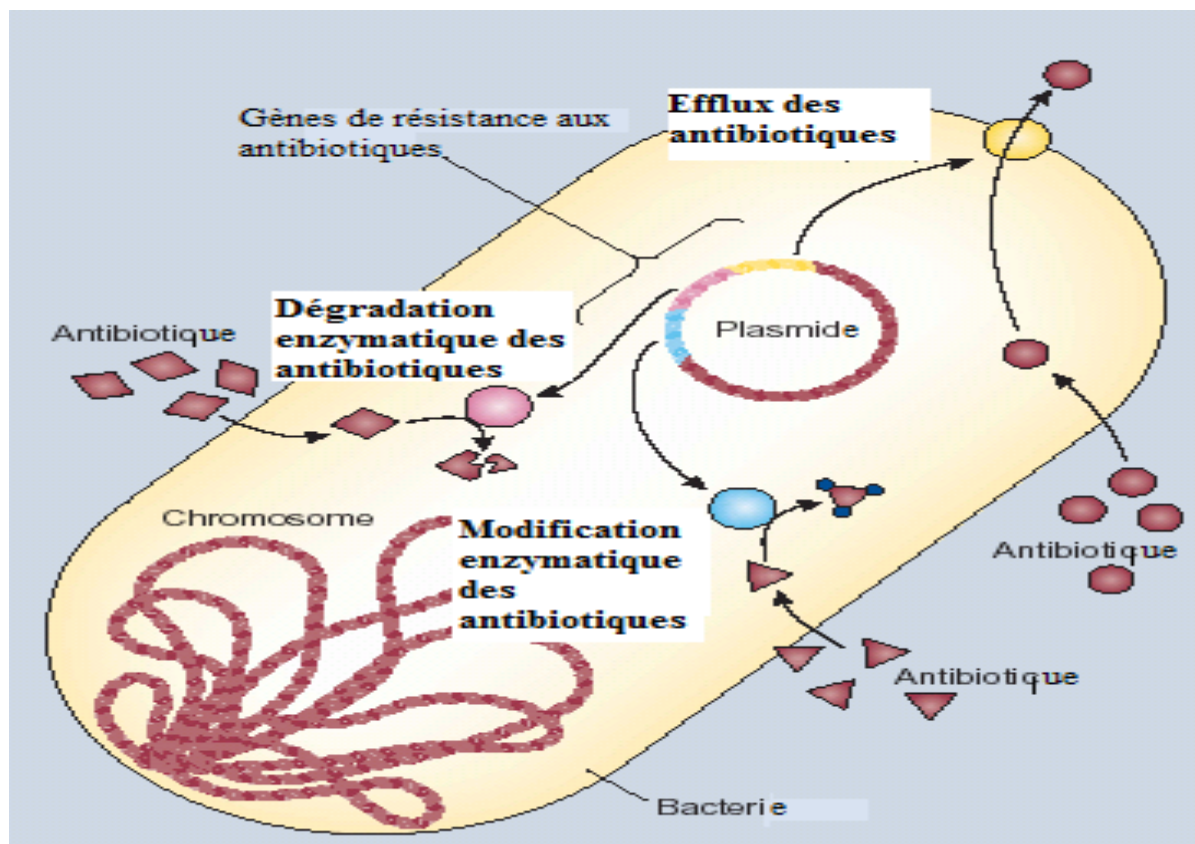


Figure 4 : Mécanismes de résistance aux antibiotiques (LEVY et MARSHALL, 2004)

I.3.1. Inactivation enzymatique de l'antibiotique

Les bactéries peuvent synthétiser des enzymes capables de détruire ou de modifier les antibiotiques. Les réactions enzymatiques, conduisant à l'inactivation des antibiotiques, peuvent s'effectuer par hydrolyse, transfert de groupements chimiques ou oxydo-réduction (WRIGHT, 2005).

L'enzyme modifie le noyau actif de l'antibiotique par clivage ou par addition d'un groupement chimique, empêchant ainsi la fixation de l'antibiotique sur sa cible et provoque

une perte d'activité (GUARDABASSI et COURVALIN, 2006 ; ALEKSHUN et LEVRY, 2007 ; NIKAIDO, 2009).

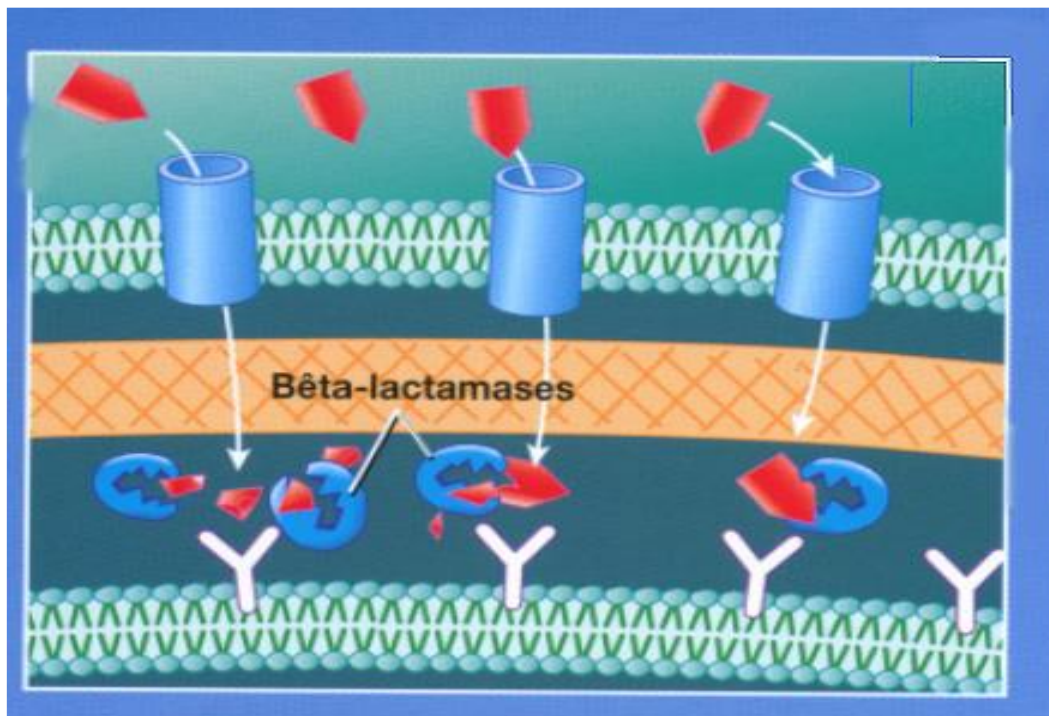


Figure 5 : Mécanisme d'inactivation enzymatique de l'antibiotique.

I.3.2. Diminution de la quantité d'antibiotique atteignant la cible

I.3.2.1. Par baisse de perméabilité membranaire

Les bactéries à Gram négatif se distinguent des bactéries à Gram positif par la présence d'une membrane externe (KUMAR et SCHWEIZER, 2005).

Pour comprendre la résistance spécifique de certaines bactéries à des antibiotiques particuliers, une compréhension de l'enveloppe cellulaire s'impose.

La membrane cytoplasmique entoure le cytoplasme, sous laquelle, la paroi cellulaire est présente. Cette paroi diffère chez les bactéries Gram négatif des bactéries à Gram positif par le fait que ces dernières possèdent une couche de peptidoglycane plus épaisse qui forme une paroi cellulaire plus rigide (Figure 6) (KUMAR et SCHWEIZER, 2005). Par contre, les bactéries à Gram négatif possèdent, au lieu d'une épaisse paroi cellulaire, une membrane externe qui est composée de phospholipides et d'une couche de LPS qui agissent comme barrière sélective dû à des glycopeptides anioniques qui sont partiellement neutralisés par des cations divalents, Mg^{2+} et Ca^{2+} (WAX *et al.*, 2008). L'espace formé entre la mince paroi cellulaire et la membrane externe est l'espace périplasmique, où certains processus cellulaires sont présents, tel que des

étapes de synthèse protéique (**WAX *et al.*, 2008**). Une autre caractéristique des bactéries à Gram négatif est la présence de porines dans la membrane externe qui permettent de faire circuler des molécules hydrophiles de tailles limitées vers l'espace périplasmique, et qui empêchent les antibiotiques lipophiles d'entrer dans la cellule. En plus de posséder des pores qui empêchent l'entrée de certains composés, les bactéries à Gram négatif ont des systèmes qui permettent de faire sortir des éléments, comme des déchets métaboliques, mais aussi des antibiotiques qui auraient des caractéristiques similaires à leurs substrats. Toutes ces propriétés de la membrane externe sont autant d'atouts contre l'action des antibiotiques (**WAX *et al.*, 2008 ; FERNANDEZ et HANCOCK, 2012**).

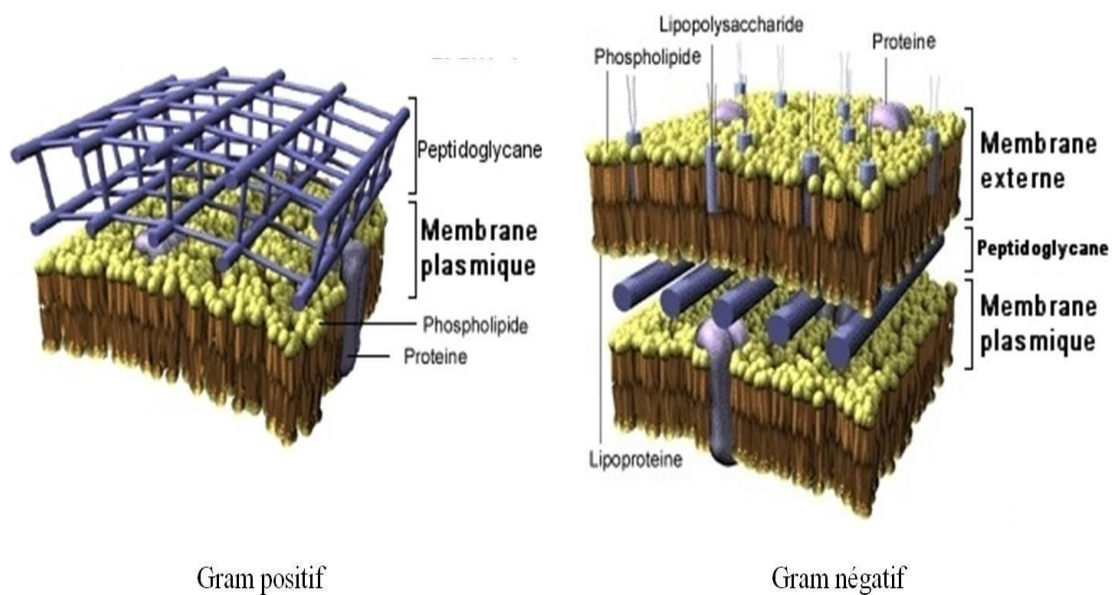


Figure 6 : Schéma des parois bactériennes des bactéries à Gram négatif et des bactéries à Gram positif. (**PRONOVOST, 2014**).

Les bactéries à Gram négatif possèdent une membrane supplémentaire, tandis que les bactéries à Gram positif ont un peptidoglycane plus épais (**PRONOVOST, 2014**).

Une bactérie largement étudiée pour sa résistance naturelle aux antibiotiques est la bactérie *P. aeruginosa*. Celle-ci est intrinsèquement résistante à plusieurs antibiotiques, entre autres, grâce à la faible perméabilité de sa membrane externe (**BREIDENSTEIN *et al.*, 2011**). En comparaison avec *E. coli*, la membrane de *P. aeruginosa* est 12 à 100 fois moins perméable (**BREIDENSTEIN *et al.*, 2011**).

Le net avantage que procure la membrane externe de bactéries à Gram négatif permet la sélection d'agents potentiellement toxiques, qui doivent impérativement franchir cette barrière soit par la diffusion à travers les porines, la diffusion à travers la membrane ou par un processus d'auto-absorption, comme dans le cas des aminoglycosides et des peptides cationiques (**KUMAR et SCHWEIZER, 2005**).

I.3.2.2. Par système d'efflux

Les bactéries, durant leurs processus cellulaires, génèrent des métabolites secondaires qui peuvent leurs être toxiques s'ils ne sont pas expulsés dans le milieu extracellulaire. Pour ce faire, elles préviennent cette accumulation par la présence de pompes énergie-dépendantes qui n'altèrent, ni ne modifient les composés extrudés (**FERNANDEZ et HANCOCK, 2012**).

Chez les bactéries à Gram négatif, les pompes à efflux sont généralement organisée en trois parties constituées : des composants de la membrane externe (OMP) et de la membrane interne et d'une protéine de fusion de membrane qui se situe dans le périplasme (MFP) (**POOLE, 2003 ; WAX et al., 2008 ; MIMA et al., 2009 ; FERNANDEZ et HANCOCK, 2012**). Ces pompes énergie-dépendantes peuvent être divisées en deux groupes distincts selon le type d'énergie qui les alimente, soit les transporteurs utilisant l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie et les pompes utilisant la force proton-motrice pour le transport (**KUMAR et SCHWEIZER, 2005 ; FERNANDEZ et HANCOCK, 2012**).

Les transporteurs *ATP-binding cassette* (ABC) sont les seuls représentants du premier groupe. Ils ont la capacité de faire entrer et sortir une vaste gamme de composé, incluant les sucres, les acides aminés, les ions, les composés médicaux, les polysaccharides et les protéines. Cependant très peu de membres de cette famille ont été identifiés comme étant impliqués dans une résistance aux antibiotiques chez un large éventail de bactéries (**KUMAR et SCHWEIZER, 2005 ; FERNANDEZ et HANCOCK, 2012**).

Les transporteurs utilisant la force proton-motrice sont les transporteurs de multi résistances secondaires. Ces systèmes d'efflux sont les plus communément rencontrés dans la résistance aux antibiotiques dans le milieu médical et peuvent être sous-divisés en quatre superfamilles basées sur l'homologie de leurs structures secondaire et primaire (**FERNANDEZ et HANCOCK, 2012**). Il s'agit de la superfamille des *major facilitator super family*(MFS), la famille des *small multi drugresistance*(SMR), la famille des *multidrug and toxic compounds extrusion* (MATE) et la superfamille des *resistance-nodulation-cell division* (RND) (**POOLE,**

2003 ; KUMAR et SCHWEIZER, 2005 ; FERNANDEZ et HANCOCK, 2012). *P. aeruginosa* contient 20 pompes MFS, deux pompes SMR, une pompe MATE et 12 pompes RND démontrées ou prédites (MIMA *et al.*, 2009 ; OLIVARES *et al.*, 2013).

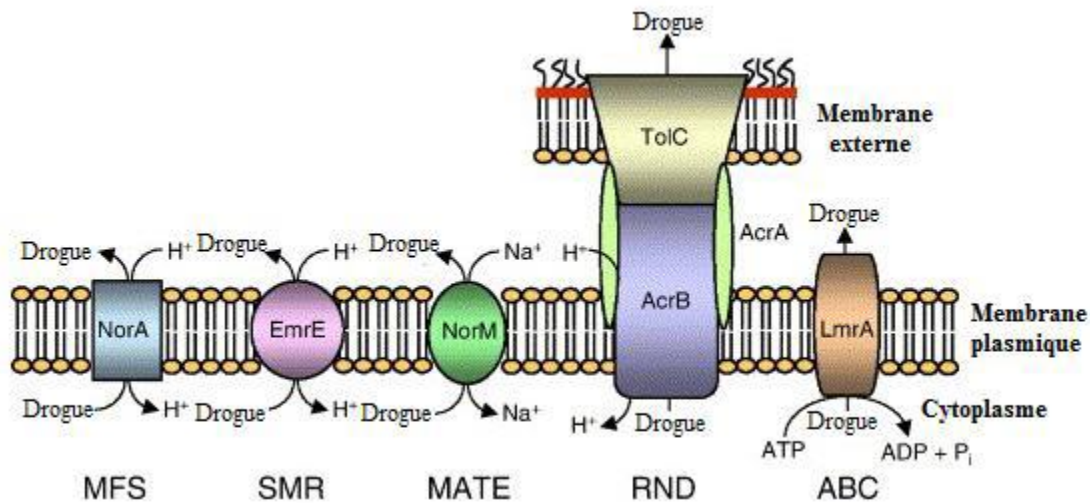


Figure 7 : Illustration schématique des principales pompes bactériennes d'efflux (KUMAR et SCHWEIZER, 2005).

I.3.3. Altération des cibles cellulaires des antibiotiques

La modification de la cible d'un antibiotique est un mécanisme commun de résistance (LAMBERT, 2005). Elle est la conséquence d'une mutation spontanée au niveau d'un gène bactérien ou de l'acquisition du gène de résistance, par conjugaison, transduction ou transformation. Les changements occasionnés doivent inhiber l'action des antibiotiques tout en maintenant la fonction cellulaire de la cible.

I.3.4. Protection de la cible

Il s'agit d'une protection réversible de la cible. Ce type de mécanisme est illustré par la résistance aux quinolones.

Depuis quelques années, des souches présentant des résistances sub-cliniques dites à bas niveau aux fluoroquinolones ont été observées. Ces résistances sont notamment dues à la présence de gènes plasmidiques (pour quinolone résistance) dont 5 groupes existent. Ce mécanisme a été rapporté parmi différentes bactéries Gram négatives à travers le monde, et des analogues de gènes ont également été décrits chez les bactéries Gram positives (RODRIGUEZ-MARTINEZ *et al.*, 2008).

I.4. Evolution rapides de la résistance aux antibiotiques :

Les différents modes d'acquisition des résistances donnent une idée de la fréquence de leurs apparitions ainsi que des activités qui les favorisent. L'acquisition de la résistance par le transfert des gènes est celle qui présente la fréquence la plus élevée. Les résistances bactériennes acquises par mutation chromosomique concernent 10 à 20% des souches isolées en clinique (**COURVALIN *et al.*, 2001**). La combinaison de ces deux modes se traduit par une augmentation de la fréquence des résistances. Certains auteurs ont observé une augmentation rapide de la fréquence d'apparition des *Staphylococcus aureus* producteurs de la pénicillinase dès les années 1945 (**BARBER, 1947 ; BUSH, 1997 ; MEDEIROS, 1997 ; BUSH, 2004**).

Il est admis par tous que l'utilisation des antibiotiques expose au risque collectif de sélection de souches bactériennes résistantes et de facilitation de leur diffusion dans la collectivité. De nombreux travaux ont étudié et quantifié le lien entre consommation d'antibiotiques et résistance, tant au niveau individuel que collectif. La relation est complexe, dépendant de nombreux facteurs liés à l'hôte et son environnement, au microorganisme, au médicament anti-infectieux. Cette corrélation dépendante également du couple bactérie-antibiotique étudié, et d'un ensemble d'autres facteurs : consommation d'autres familles d'ATB, influence du temps d'observation et de la répétition des mesures (méthode des séries temporelles), de la Pression de colonisation et respect des règles d'hygiène (**MAGIORAKOS *et al.*, 2011**)

II. Résistance des champignons

II.1. Définition

La résistance aux fongicides est une réduction stable de la sensibilité d'un champignon à un fongicide donné. Cette réduction de la sensibilité résulte, la plupart du temps, d'une sélection de souches résistantes *présentes* naturellement à l'intérieur de la population d'un champignon. Beaucoup plus rare (une fois sur 100 millions), la résistance peut être le résultat d'une mutation génétique chez une souche du champignon (**REJEAN BACON, 2002**).

II.2. Types de résistances aux antifongiques

En Mycologie médicale et vétérinaire, on distingue deux types de résistance :

II.2.1. Résistance intrinsèque

Ce type de résistance est naturellement présent chez toutes les souches d'une même espèce ou d'un même genre. Peut être due à une absence de concentration de l'antifongique dans la cellule ou à une faible affinité de l'antifongique pour sa cible. Ce processus est bien connu pour la levure *Candida krusei*, naturellement résistante au fluconazole. L'emploi fréquent de cet antifongique en médecine humaine, en prophylaxie ou en traitement curatif des candidoses a eu pour conséquence le remplacement progressif de l'espèce endogène sensible, *Candida albicans*, par d'autres espèces du genre *Candida* (dont *C. krusei*, *C. glabrata* ou *C. parapsilosis*) (GUINEA, 2014). La résistance naturelle de la moisissure *Aspergillus terreus* à l'amphotéricine B est également décrite. Plus récemment, la moindre sensibilité du dermatophyte géophile *Microsporum gypseum* vis-à-vis de la griséofulvine a été rapportée (NARDONI *et al.*, 2013).

II.2.2. Résistance acquise

La résistance acquise est un processus dynamique qui peut potentiellement être observé chez n'importe quelle espèce fongique et vis-à-vis de n'importe quelle molécule antifongique. Les mécanismes moléculaires qui rendent compte de ce mode de résistance incluent :

- la modification de la cible de l'antifongique (liée à une ou plusieurs mutations du gène codant pour la cible) ;
- la surexpression de la cible de l'antifongique (par exemple liée à une modification du promoteur du gène) et
- la surexpression de pompes membranaires d'efflux (qui réduisent rapidement la concentration d'antifongiques dans la cellule fongique) (CUENCA-ESTRELLA, 2014).

II.3. Les mécanismes de résistance

La résistance aux antifongiques peut résulter d'un mécanisme épigénétique, par exemple la capacité à former des biofilms qui limitent le passage de l'antifongique à l'intérieur de la cellule.

II.3.1. Production des gènes responsables de la résistance

La résistance pourrait être due, en, partie, à la surface induite par la sup-régulation des pompes à efflux (**JABRA-RIZK et al., 2004**). Ces dernières sont codées par la majorité des gènes qui contribuent à la résistance aux différents traitements antimicrobiens (**CHANDRA et al., 2001**) ; (**DOUGLAS, 2002**) ; (**HARRY et al., 2002**) ; (**RAMAGE et al., 2002**) ; (**WHITE et al., 2002**).

L'expression des gènes codant pour les transporteurs multi-drogues joue un rôle important dans l'apparition de la résistance de *Candida albicans* aux antifongiques. En particulier, les Transporteurs ABC sont faiblement exprimés chez les souches sauvages. Les promoteurs de deux gènes codant pour des transporteurs ont été analysés et ont permis l'identification de régions régulatrices communes (**DONLAN, 2002**).

II.3.2. Capacité à former les biofilms

L'augmentation de la résistance aux antifongiques est induite par l'adhésion des cellules aux surfaces, elle est associée à une augmentation concomitante de l'activité métabolique du développement du biofilm (**MATEUS et al., 2004**) ; (**NETT et al., 2008**). En effet, les biofilms constituent une barrière physique qui empêchent la pénétration efficace des médicaments antimicrobiens, conférant ainsi à ces communautés, une plus grande résistance vis-à-vis de l'activité antimicrobienne que leurs homologues planctoniques (**CHANDRA et al., 2001**) ; (**HALL-STOODLEY et al., 2004**).

Les biofilms sont des communautés de microorganismes adhérentes à une surface et produisant une matrice exopolymérique (**BLANKENSHIP, MITCHELL., 2006**). Les biofilms générés par les *Candida* représentent un vrai problème clinique. Ils peuvent se former sur des surfaces naturelles telles qu'un endothélium vasculaire endommagé (**DOUGLAS, 2003**), mais le plus souvent sur une surface synthétique, comme celle d'un cathéter veineux central, d'un dentier ou d'une valve cardiaque (**ANDES et al., 2004**).

I. Lutte contre la résistance bactérienne

Le 30 avril 2014, l'OMS a publié un rapport où la résistance aux antibiotiques est qualifiée de grave menace pour la santé publique. Les résultats de ce rapport sont très préoccupants car ils témoignent de la résistance à tous les antibiotiques, même à ceux de derniers recours. Selon le Dr FUKUDA, Sous-directeur général de l'OMS pour la sécurité sanitaire, il convient à chacun d'agir en urgence et de manière coordonnée, afin d'éviter d'arriver dans une ère post-antibiotiques où la moindre infection courante ou blessure mineure peut de nouveau tuer (OMS, 2014).

Dans ce contexte, la lutte contre l'antibio-résistance apparaît essentielle. Cette résistance ne peut pas être totalement éliminée, mais il est impératif de prendre des mesures afin de limiter ce phénomène. Différentes perspectives sont étudiées pour minimiser la résistance bactérienne aux antibiotiques.

I.1. Les différentes politiques européennes et internationales

Le développement des échanges entre pays et continents joue un rôle majeur par sa contribution dans l'accroissement de la mondialisation du phénomène de résistance bactérienne et de bactéries multi-résistantes. Une dimension européenne et internationale est donc primordiale à la lutte contre l'antibio-résistance.

Dans les établissements de santé, des actions ont été initiées dès le début des années 1990, en matière de surveillance et de prévention de la transmission croisée des bactéries multi-résistantes, avec notamment l'élaboration et la diffusion d'un certain nombre de recommandations (le Ministère du Travail, de l'Emploi et de la Santé, 2011).

I.1.1. En Europe

En septembre 1998, au cours de la conférence de Copenhague, « The Microbial Threat », les états membres ont pris conscience que la résistance microbienne était une préoccupation internationale majeure. Ainsi une stratégie commune a été définie à l'échelle européenne et des recommandations ont été émises concernant la surveillance des bactéries résistantes aux antibiotiques, le suivi des consommations d'antibiotiques, le développement de la politique de bon usage des antibiotiques et la recherche sur les résistances bactériennes pour combattre ce problème (GAUDEL, 2013).

Selon le Ministère du Travail, de l'Emploi et de la Santé, (2011) la problématique de la surconsommation des antibiotiques a amené à l'adoption en novembre 2001 de la

recommandation 2002/77/CE du conseil, relative à l'utilisation prudente des agents antimicrobiens en médecine humaine.

En 2005 une agence indépendante de l'Union européenne, le Centre Européen de Prévention et Contrôle des Maladies (CEPCM) a été créé et a pris des responsabilités croissantes dans le renforcement des défenses de l'Europe contre les maladies infectieuses **(ECDC, 2005)**.

Suite à la demande du Conseil en 2009, et du Parlement Européen en 2011, la Commission Européenne a renforcé son engagement par un plan d'actions sur cinq ans, déclinés en douze actions clés, pour combattre les menaces croissantes de la résistance aux antibiotiques. Ces douze actions clés sont les suivantes **(Commission européenne, 2011)**:

- Développer l'utilisation appropriée des antimicrobiens dans tous les états membres ;
- Renforcer le cadre réglementaire dans le domaine des médicaments vétérinaires et des aliments médicamenteux pour animaux ;
- Instaurer des recommandations sur l'utilisation prudente d'antimicrobiens en médecine vétérinaire, y compris des rapports de suivi ;
- Renforcer la prévention des infections et la lutte contre celles-ci dans les établissements de soins ;
- Intégrer à la nouvelle législation sur la santé animale un outil juridique destiné à renforcer la prévention des infections et la lutte contre celles-ci chez les animaux ;
- Favoriser de nouveaux efforts de recherche et de développement pour mettre de nouveaux antimicrobiens à la disposition des patients ;
- Encourager les efforts visant à analyser la nécessité de disposer de nouveaux antibiotiques en médecine vétérinaire ;
- Favoriser et/ou renforcer les engagements multilatéraux et bilatéraux aux fins de la prévention de la résistance aux antimicrobiens et de la lutte contre celle-ci dans tous les secteurs ;
- Renforcer les systèmes de surveillance de la résistance aux antimicrobiens et de la consommation d'antimicrobiens en médecine humaine ;
- Renforcer les systèmes de surveillance de la résistance aux antimicrobiens et de la consommation d'antimicrobiens en médecine vétérinaire ;
- Renforcer et coordonner les efforts de recherche ;
- Enquête et recherche d'efficacité comparative.

I.1.2. Au niveau international

L'OMS accorde une grande priorité à la lutte contre la résistance aux antibiotiques. Un plan d'action mondial pour combattre la résistance aux antimicrobiens, qui inclut la résistance aux antibiotiques, a été approuvé par l'Assemblée mondiale de la Santé en mai 2015. Il vise à préserver notre capacité de prévenir et traiter les maladies infectieuses à l'aide de médicaments sûrs et efficaces (OMS, 2016).

Ce plan d'action mondial définit 5 objectifs stratégiques :

- améliorer la sensibilisation et la compréhension du phénomène de résistance aux antimicrobiens ;
- renforcer la surveillance et la recherche ;
- réduire l'incidence des infections ;
- optimiser l'usage des agents antimicrobiens ;
- consentir des investissements durables pour combattre la résistance aux antimicrobiens.

Dans le contexte actuel de surconsommation des antibiotiques en médecine humaine mais aussi vétérinaire, les autorités américaines ont publié récemment un plan stratégique 2012-2016, le National Antimicrobial Resistance Monitoring Système (NARMS), qui est un programme de surveillance de la sensibilité des entérobactéries aux antibiotiques. Le but de ce programme est d'évaluer l'impact de l'utilisation des antibiotiques en médecine vétérinaire sur la santé humaine (GAUDEL, 2013).

II. Lutte contre la résistance fongique

II.1. Stratégies de protection des plantes contre *Botrytis cinerea*

À l'heure actuelle, il n'existe aucune variété commerciale résistante à la pourriture grise pour l'ensemble des cultures attaquées par le champignon. Cependant, il existe d'importantes différences dans la sensibilité, qui sont attribuées aux différences d'architecture de la plante et à la densité de feuillage (DIK et WUBBEN, 2004). Toutefois, certaines résistances décrites sont d'origine génétique ; la résistance de la tomate à *B. cinerea* est liée à différents gènes de résistance chez l'hôte (DIK et WUBBEN, 2004; FINKERS *et al.*, 2008). La lutte contre *Botrytis cinerea* repose principalement sur l'utilisation de produits phytosanitaires. Différentes

stratégies de lutte culturale ont aussi été développées et de nombreux travaux sont effectués pour mettre en place et développer des stratégies de lutte biologique efficace. Actuellement, aucune des méthodes disponibles ne permet de garantir une efficacité totale contre *B. cinerea* dans les cultures.

II.2. Lutte chimique

La lutte chimique se définit par l'utilisation de fongicides pour détruire, affaiblir ou réprimer le champignon. A partir des années 1950, il y a eu une expansion rapide de l'emploi de produits phytopharmaceutiques. Les fongicides anti-*Botrytis* utilisés en végétation ont largement évolué depuis le début des années 1970 (**LEROUX et al., 1999**).

Les fongicides restent des outils indispensables pour lutter contre *B. cinerea* en pré- et post-récolte et assurer une production suffisante (**LEROUX, 2004**). La plupart des fongicides affectent directement des fonctions essentielles, comme par exemple la respiration, la biosynthèse des stérols ou la division cellulaire (**LEROUX, 2004**). L'utilisation de produits phytopharmaceutiques peut entraîner le développement de souches résistantes à ces fongicides (**LATORRE et al., 2002; LEROUX, 2004; SERGEEVA et al., 2002**).

Actuellement, on observe des résistances à la majorité des familles de fongicides utilisées contre *B. cinerea* (**COUDERCHET, 2003; LEROUX, 2004**). Ces phénomènes de résistance constituent un problème dans la lutte contre cette espèce, justifiant ainsi l'intérêt actuel pour l'étude de méthodes alternatives à la lutte chimique contre ce champignon.

II.3. Prophylaxie

La prophylaxie repose sur des moyens directs visant à éloigner ou à combattre l'organisme indésirable en situation de nuire ou sur des mesures indirectes ayant pour objectif de minimiser ou de rendre impossible l'expression de la nuisibilité de l'organisme considéré. Ces mesures prophylactiques occupent une place importante dans la lutte contre les maladies fongiques des plantes.

II.4. Protection biologique

Le terme "lutte biologique" recouvre différents concepts selon les disciplines impliquées dans la protection des cultures (**NORDLUND, 1996**). La définition officielle par l'OILB (Organisation Internationale de la Lutte Biologique) stipule que la protection biologique est « l'utilisation d'organismes vivants pour prévenir ou réduire les dégâts causés par des ravageurs ».

Selon **GUETSKY *et al.* (2001)**, la lutte biologique consiste à augmenter la population d'un autre microbe qui va parasiter le champignon (hyperparasite) ou qui va prendre sa place (antagoniste) sans affecter la culture à protéger.

La lutte contre le Botrytis est possible par l'utilisation de biofongicides qui renferment une quantité efficace de souches bactériennes et de levure et qui présentent également l'avantage d'exercer un effet d'éléciteur qui se traduit par une activation des défenses naturelles de la plante.

I. Matériels

I.1. Les souches bactériennes

Les souches bactériennes utilisées dans la présente étude sont des bactéries impliquées dans des pathologies humaines diverses, et elles sont souvent responsables d'infections nosocomiales. Nous avons sélectionné trois bactéries à Gram négatif et une bactérie à Gram positif (tableau I).

Tableau I : Tableau descriptif des différentes bactéries utilisées dans notre étude.

Les souches bactériennes	Type de Gram	provenance
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Gram négatif	Laboratoire de microbiologie de CHU de Tizi-Ouzou.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram positif	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Gram négatif	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	Gram négatif	Laboratoire de microbiologie de l'UMMTO.

I.1.1. *Acinetobacter baumannii*

La bactérie utilisée dans notre étude est résistante à 12 antibiotiques (CHU Tizi Ouzou).

Tableau II : Antibiogramme réalisé sur l'*A. baumannii* au niveau du CHU de Tizi Ouzou.

Antibiotique	Diamètre	Sensibilité
Amikacine	6 mm	Résistant
Céfotaxime	6 mm	Résistant
Colistine	17 mm	
Gentamicine	6 mm	Résistant
Ticarcilline	6 mm	Résistant
Trimethoprim/ Sulfamethoxazole	6 mm	Résistant
Ticarcilline/ Acide clavulanique	6 mm	Résistant
Ampicilline	6 mm	Résistant
Ceftazidime	6 mm	Résistant
Imipenem	13 mm	Résistant
Tobramycine	6 mm	Résistant
Ciprofloxacine	6 mm	Résistant
Levofloxacine	11 mm	Résistant

I.1.2. *Staphylococcus aureus*

La bactérie utilisée dans notre étude est résistante à 7 antibiotiques (CHU Tizi Ouzou), (tableau III).

Tableau III : Antibiogramme réalisé sur *S. aureus* au niveau du CHU de Tizi Ouzou.

Antibiotique	Diamètre	Sensibilité
Amikacine	10 mm	Résistant
Erythromycine	25 mm	Sensible
Gentamicine	6 mm	Résistant
Pristinamycine	27 mm	Sensible
Tetracycline	6 mm	Résistant
Oxacillin	6 mm	Résistant
teicoplanine	13 mm	Résistant
Clindamycine	23 mm	Sensible
Acide fusidique	26 mm	Sensible
Penicilline G	6 mm	Résistant
Rifampicine	15 mm	Intermédiaire
Vancomycine	19 mm	Sensible
Céfoxitine	6 mm	Résistant

I.1.3. *Klebsiella pneumoniae*

La bactérie utilisée dans notre étude est résistante à 8 antibiotiques (CHU Tizi Ouzou), (tableau IV).

Tableau IV : Antibiogramme réalisé sur *K. pneumoniae* au niveau du CHU de Tizi Ouzou.

Antibiotique	Diamètre	Sensibilité
Amikacine	20 mm	Sensible
Ampicilline	6 mm	Résistant
Céfotaxime	6 mm	Résistant
Colistine	18 mm	Sensible
Gentamicine	11 mm	Résistant
Trimethoprim/ Sulfamethoxazole	6 mm	Résistant
Ciprofloxacine	6 mm	Résistant
Amoxicilline/ Acide clavulanique	6 mm	Résistant
Céfazoline	6 mm	Résistant
Chloramphenicol	26 mm	Sensible
Fosfomycine	26 mm	Sensible
Imipenem	36 mm	Sensible
Aztréonam	6 mm	Résistant

I.1.4. *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)

P. aeruginosa est naturellement résistant aux pénicillines, aux céphalosporines de première et deuxième génération et à la plupart des céphalosporines de troisième génération.

I.2. Le champignon (*Botrytis cinerea*)

Le champignon *Botrytis cinerea* provient du laboratoire QSA (Qualité et Sécurité des Alimentation) UMMTO et il est fourni par Mr. OUELHADJ.

I.3. Les huiles essentielles

Les deux huiles essentielles étudiées sont fournis par Mr OUELHADJ. Elles sont 100% pures et d'origine naturelle et les ingrédients sont issus de l'agriculture biologique.

Tableau V : Tableau descriptif des deux huiles essentielles utilisées dans notre étude.

Huiles essentielles	Nom latin	provenance	contrôle
Cèdre de l'Atlas	<i>Cedrus atlantica</i>	Laboratoire Pierre FABRE	ECOCERT
L'origan	<i>Origanum compactum</i>		ECOCERT

I.4. Appareillage

- Autoclave : WEBECO. Allemagne ;
- Agitateur à barreau magnétique non chauffant : GERHARDT. Allemagne ;
- Bain Marie : MEMMERT. Allemagne ;
- Balance de précision : KERN 770. Allemagne ;
- Etuve : BINDER. Allemagne ;
- Réfrigérateur : ENIEM. Algérie ;
- Spectrophotomètre: Vis-7220G. Biotech Engineering. Management CO.LTD (UK).

I.5. Milieux de culture

- Gélose nutritive : gélose de Mueller Hinton ;
- Milieux liquides : Brain Heart Infusion Broth (BHIB) ;
- Milieux d'isolement : milieux Sabouraud.

Les milieux de culture proviennent du laboratoire Conda (Espagne). La composition chimique de ces milieux est décrite dans l'annexe 1.

I.6. Emulsifiant

Diméthyle Sulfoxide (DMSO), liquide organique, miscible à l'eau et utilisé pour la dilution des huiles essentielles testées.

I.7. Les antibiotiques

Les antibiotiques sont fournis par le laboratoire de microbiologie de l'UMMTO et proviennent de Bioanalyse Inde laboratoires.

- Colistine (CS) de 50 µg/disque ;
- Imipenem (IM) de 10 µg/disque ;
- Pénicilline (P) de 6 µg/disque ;
- Rifampicine (RA) de 30 µg/disque.

I.8. L'antifongique

Le fungizone 10%.Haupt pharma walfratshansen.

II. Méthodes

II.1. Test de confirmation des souches bactériennes

Toute notre étude a été réalisée dans les conditions aseptiques devant le bec bunsen, les souches étudiées ont été revivifiées sur milieu BHIB, incubées à 37°C pendant 24h, puis repiquées sur milieu Mueller Hinton Agar (MHA) et incubées à 37°C pendant 24h afin d'obtenir des souches jeunes de 24h.

Une coloration de Gram a été réalisée selon la méthode décrite par **DELARRAS (2007)** comme suite :

- Préparer un frottis ;
- Recouvrir le frottis avec le Violet de Gentiane pendant 1mn puis rincer à l'eau ;
- Fixer avec le lugol et laisser agir 2 fois 45secondes puis rincer à l'eau ;
- Décolorer à l'alcool 95°, entre 15 à 30 secondes, rincer à l'eau ;
- Contre coloration avec la fuschine pendant 10 à 30 secondes puis rincé à l'eau ;
- Sécher au-dessus de la flamme du bec bunsen ;
- Observer au microscope optique au grossissement 1000.

La coloration de Gram et l'observation à l'immersion, nous ont permet de définir le type de Gram, la forme et le regroupement des bactéries.

Les bactéries qui ne sont pas décolorées par l'alcool et garde la couleur violette sont des bactéries à Gram positif, et celles colorées en rose (fuschine) sont des bactéries à Gram négatif.

II.2. préparation de l'inoculum

II.2.1. Préparation des pré-cultures

Les bactéries à tester sont revivifiées dans un milieu BHIB, puis ensemencées sur des boîtes de Pétri contenant la gélose MH et incubées pendant 24h à 37°C, afin d'obtenir des cultures jeunes en phase exponentielle de croissance.

II.2.2. Préparation des suspensions bactériennes

A partir des boîtes de Pétri repiquées, à l'aide d'une anse à boucle de platine nous avons prélevé quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques, et nous les avons mises dans 15ml d'eau physiologique stérile à 0,9% NaCl. Après homogénéisation des suspensions bactériennes nous avons mesuré leurs densités optiques à une longueur d'onde de 620nm. La DO lue à cette longueur d'onde est justifiée à 0,08 à 0,10 nm, l'équivalent de 10^7 UFC/ml. L'inoculum est ajusté soit en ajoutant des colonies de notre souches si la DO est faible ou de l'eau physiologique stérile si elle est forte, puis nous avons réalisé une dilution de 1/10 afin de réduire la charge bactérienne à 10^6 UFC/ml.

II.3. Activité antibactérienne

L'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles du cèdre de l'Atlas et de l'origan est réalisée d'abord dans un milieu solide de MHA par diffusion des disques. Cette technique nous permet de tester la sensibilité des bactéries.

Une CMI est ensuite réalisée dans un milieu liquide de BHIB par la méthode de macro-dilution. Cette technique nous permet de connaître la nature de l'activité antibactérienne des H.Es (bactériostatique ou bactéricide).

II.3.1. Test d'aromatogramme

L'aromatogramme permet d'estimer l'inhibition de la croissance des germes au contact des H.Es (*Cedrus atlantica* et *Origanum compactum*). 120 µl de chaque suspension standardisée et dilué à 10^6 UFC/ml est introduite dans chaque boîte Pétri et étalée avec un râteau, ou ensemencé avec un écouvillon déjà imbibé dans la suspension.

Des disques de papier Wattman stériles de 6mm de diamètre ont été déposés au centre de chaque boîte à l'aide d'une pince stérile. Nous avons additionné un émulsifiant Diméthyle Sulfoxyde (DMSO) aux H.Es à tester à raison de (5% V/V) puis nous avons mis 10 µl de l'H.E sur les disques.

Nous avons réalisé un témoin négatif et ce sans l'ajout de l'huile essentielle mais le dépôt de 10 µl de DMSO seulement sur le disque entreposés sur un milieu préalablement ensemencé de la bactérie teste. Le témoin positif a été réalisé par un dépôt des 4 antibiotiques sur les boîtes ensemencées.

Chaque essaie est répété trois fois, les boîtes ont été incubées à l'étuves à 37°C pendant 24h. La lecture consiste en la mesure du diamètre de la zone d'inhibition, selon **PONCE *et al.* (2003)**, la sensibilité des souches vis-à-vis des H.Es est déterminée comme suite :

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

II.3.2. Détermination de la Concentration minimale inhibitrice (CMI)

La souche bactérienne ayant une grande zone d'inhibition a été sélectionnée pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI), ainsi qu'une autre souche qui est référencée. La CMI représente la plus faible concentration d'H.E inhibant toute croissance visible à l'œil nu après 24h d'incubation à 37°C.

- **Technique de la macro-dilution**

Cette méthode a été réalisée dans 10 tubes stériles, chaque tube nous lui avons introduit 2ml du BHIB. Au même temps une solution mère a été préparée avec 450 µl d'H.E additionnée du DMSO (5% V/V) placés dans un tube contenant 3,55 ml de BHIB. A partir de cette solution, on a effectué des dilutions de demi en demi de manière à obtenir des concentrations finales s'échelonnant de 63,38 µl/ml à 0,12 µl/ml. Les valeurs de dilution sont résumées dans le tableau VI.

Tableau VI : Valeurs des dilutions utilisées dans la concentration minimale inhibitrice.

Rapport de dilution d'H.E	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024
(%)	50	25	12,5	6,25	3,12	1,5	0,78	0,4	0,2	0,1
µl H.E/ml	63,38	31,69	15,85	7,92	3,96	1,98	0,99	0,49	0,25	0,12

10,5 µl de la suspension bactérienne standardisée à 10^6 UFC/ml sont déposés dans chacun des tubes. Le témoin négatif est constitué de 2ml BHIB, 10,5 µl de la suspension bactérienne et 5% DMSO.

Chaque essai est répété deux fois. Les tubes ont été incubés à 37°C pendant 24h et la lecture consiste en l'observation de présence ou absence d'un trouble à l'œil nu.

Le premier tube qui n'a pas eu de trouble représente la CMI, il est ensemencé sur un milieu solide MHA et incubé à 37°C pendant 24h. On parle d'un effet bactériostatique en présence du développement bactérien et d'un effet bactéricide en son absence.

II.4. Analyse statistique

L'analyse de la variance a été réalisée par le logiciel statistique (Statistica 7.1.). Toutes les expériences ont été réalisées en triple, les résultats ont été représentés par la moyenne et son écart type. Les différences ont été considérées significatives à $P \leq 0,05$.

- $P > 0,05 \rightarrow$ différence non significative ;
- $P \leq 0,05$ et $P > 0,01 \rightarrow$ différence significative ;
- $P \leq 0,01$ et $P > 0,001 \rightarrow$ différence hautement significative ;
- $P \leq 0,001 \rightarrow$ différence très hautement significative.

II.5. Champignon *Botrytis cinerea*

II.5.1. Pureté de la souche fongique

A partir d'une boîte pétrie contenant le champignon à étudier, un repiquage sur milieu Sabouraud a été effectué à l'aide d'une anse à boucle.

Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées pendant 4 jours à 25°C et la pureté est vérifiée à l'issue de cette période d'incubation.

Aussi une identification macroscopique et microscopique de *Botrytis cinerea* a été nécessaire.

II.5.2.Préparation de la suspension fongique

A partir d'une culture jeune de *B.cinerea* en boîte sur Sabouraud gélose. Des spores sont prélevées et mises en suspension dans 10 ml d'eau physiologique. Un comptage des spores est réalisé sur la cellule de Thomas. La concentration cellulaire de cette solution est ensuite ajustée de 10⁶ cellules/ml. 150 µl sont prélevés à partir de cette suspension, et étalés en surface à l'aide d'un râteau sur un milieu Sabouraud. Les boîtes sont incubées pendant 72 h à 25°C.

II.5.3. Activité antifongique de l'huile essentielle d'*Origanum compactum*

II.5.3.1. Méthode par contact direct

L'huile essentielle d'*Origanum compactum* est diluée dans du DMSO à raison de 5%.Après avoir liquéfié le milieu Sabouraud, 15 ml sont coulés sur boîtes Pétri après l'addition de l'huile essentielle de façon à obtenir les concentrations suivantes : 0,66 ; 1 ; 1,66 et 2,33µl/ml, c'est-à-dire par l'addition de 10 ; 15 ; 25 et 35 µl d'huile à 15 ml du milieu Sabouraud.

Une fois le milieu solidifié, des disques mycéliens de 6 mm de diamètre, prélevés d'une pré-culture jeune (72 heures), sont déposés au centre de chaque boîte de Pétri, à raison d'un disque par boîte. Deux témoins sont réalisés :

- Un témoin positif, addition de 15 µl du fungizone (préparé à raison de 10g /100ml d'eau distillée) à 15ml du milieu Sabouraud liquéfié ;
- Un témoin négatif, boîte Pétri contenant 15ml du milieu Sabouraud.

Les boîtes sont incubées à 25°C pendant 7 jours.

II.5.3.2. Méthode par contact indirect

Au centre d'une boîte Pétri contenant 15 ml du milieu Sabouraud, déposer un disque mycélien de 6 mm de diamètre, prélevé d'une pré-culture jeune (72 heures).

Sur le couvercle de la boîte, déposer 4 disques du papier wattman imbibés de 10 µl l'H.E d'*Origanum compactum*.

Deux répétitions sont réalisées. Les boîtes sont ensuite incubées à 25°C pendant 7 jours. Lecture et expression des résultats :

La croissance mycélienne a fait l'objet d'un suivi quotidien, elle a été évaluée toutes

les 24h par la mesure de 2 diamètres perpendiculaires, à l'aide d'une règle, en prenant soin de passer par le milieu du disque de chaque test.

L'indice antifongique (pourcentage d'inhibition) est déterminé par la formule de **WANG *et al.* (2005)**:

$$I (\%) = (A - B)/A \times 100$$

I = indice antifongique.

A = diamètre moyen des colonies témoins

B = diamètre moyen des colonies traitées

II.5.4. Application de l'huile essentielle d'*Origanum compactum* sur une matrice alimentaire

Nous avons choisis de tester l'activité antifongique de l'H.E d'*Origanum compactum* sur des tomates contaminées avec *Botrytis cinerea*.

Des tomates sont achetées au marché Rahma de la ville de Tizi-Ouzou, afin de réaliser ce test. Les tomates sont sélectionnées de façon à avoir des tomates de la même taille, de la même couleur, ne présentant pas de blessure, ni d'impureté ou d'infection fongique visible à l'œil nu.

Les tomates sont lavées, une à une, dans de l'eau javellisée diluée à 1%, puis rincées à l'eau distillée. Elles sont ensuite séchées à l'aide d'un papier absorbant. Une fois cette étape réalisée, on dépose les tomates dans les barquettes, à raison de deux tomates par boîte. Les tomates sont incisées en 2 endroits, à l'aide d'un couteau stérilisé. Les incisions sont uniformes, de 1 cm de largeur.

Les barquettes ainsi que le traitement effectué sont répartis comme suit :

Barquettes 1 et 2 : les tomates sont incisées. Quelques hyphes du champignon *B.cinerea* sont déposés sur chaque incision.

Barquettes 3 et 4 : Sur les deux incisions des tomates, quelques hyphes du champignon sont déposés. Des disques de papier filtre sont imbibés de 10 µl d'huile essentielle et répartis tout autour des tomates.

Les barquettes sont déposées à la température de 4°C, et les diamètres de croissance mycélienne font l'objet d'un suivi quotidien.

I. Résultat du test de confirmation des souches bactériennes

La coloration de Gram nous a révélé les caractéristiques morphologiques des bactéries testées (Tableau VII).

Tableau VII : Caractères morphologiques étudiés pour la vérification des souches testées.

Les souches bactériennes	Type de Gram	Forme
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Gram négatif	Coccobacille
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram positif	Cocci en grappe de raisin
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Gram négatif	Coccobacille
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	Gram négatif	Bacille

II. Résultats des témoins négatifs

Les témoins négatifs réalisés avec le DMSO pour les quatre souches testées sont représentés dans la figure 8.

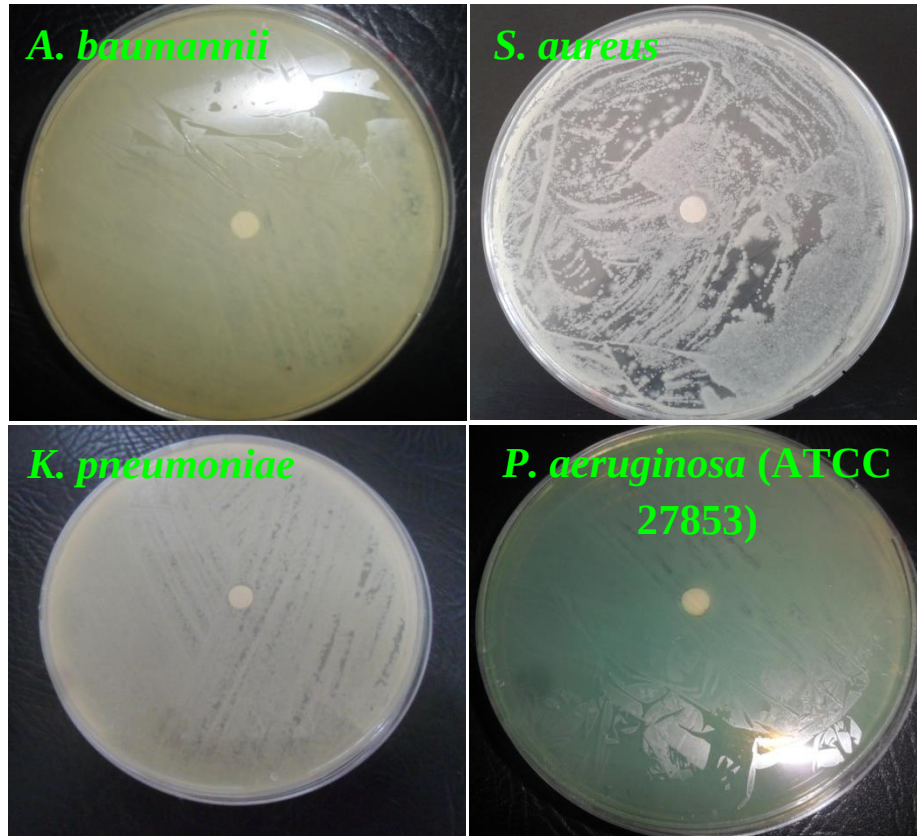


Figure 8 : Témoins négatifs réalisés avec le DMSO.

III. Résultats des témoins positifs

Les témoins positifs réalisés avec les quatre antibiotiques : colistine (Cs), imipénème (I), pénicilline (P), rifampicine (Ra) sont représentés dans la figure 9.

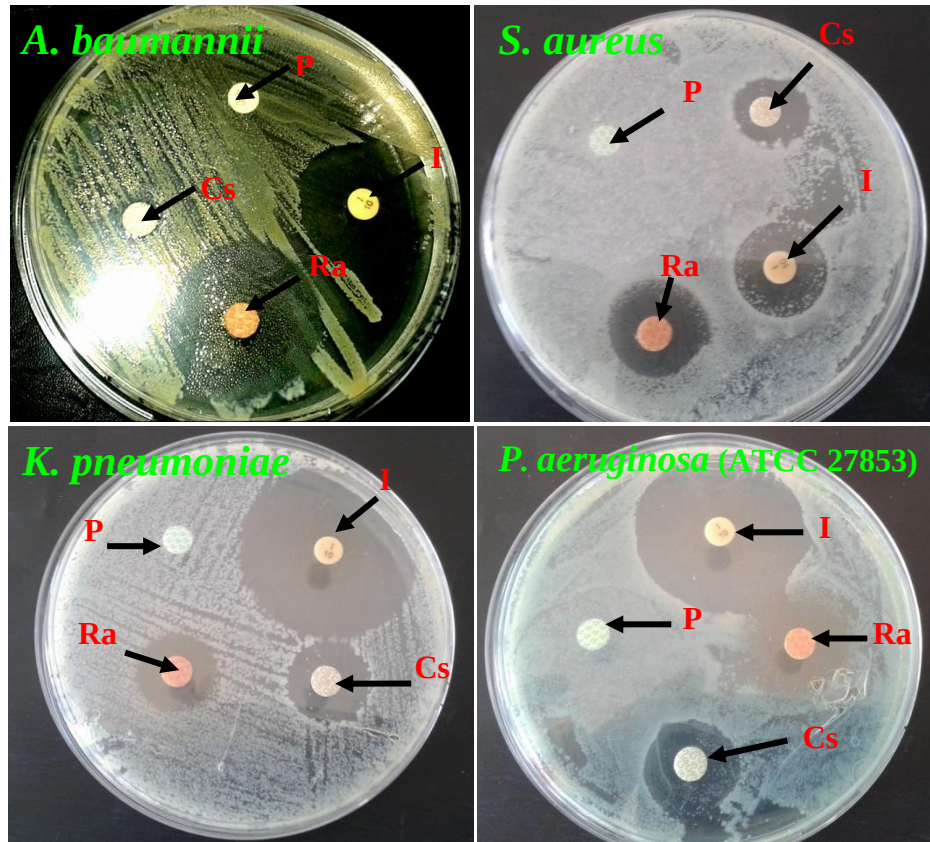
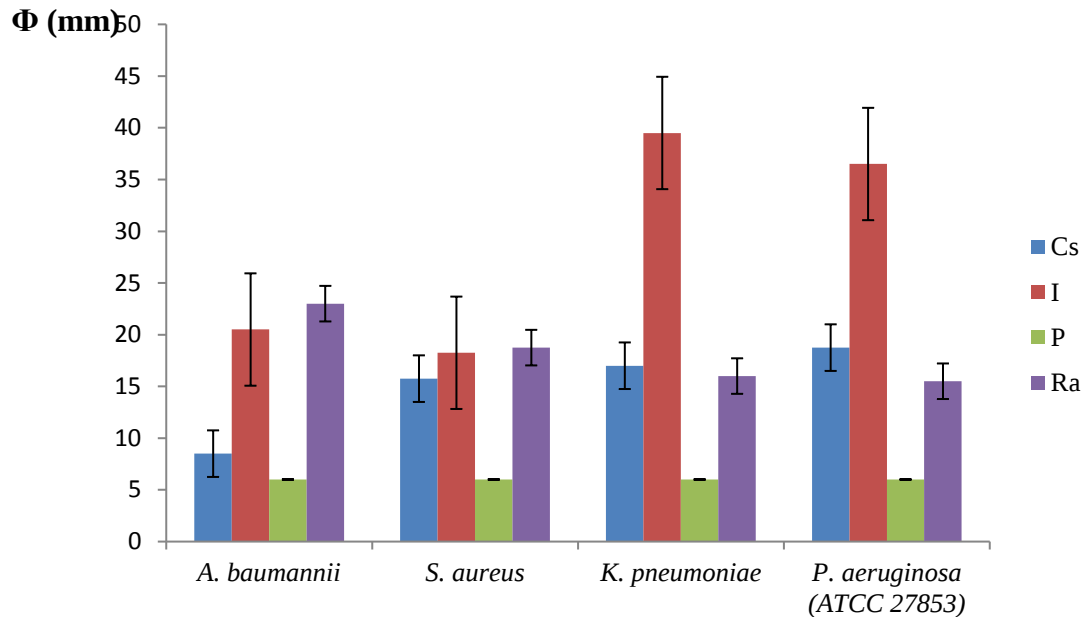


Figure 9 : Témoins positifs réalisés avec les antibiotiques.

Tableau VIII : Résultats des diamètres des zones d'inhibition en mm (moyenne $\pm$ l'écart type) des antibiotiques sur les quatre souches bactériennes.

	Diamètres des zones d'inhibition en (mm) (moyenne des deux essais $\pm$ l'écart type)			
	Colistine	Imipénème	Pénicilline	Rifampicine
ATB Souches				
<i>A. baumannii</i>	8,50 $\pm$ 0,70	20,50 $\pm$ 0,70	6,00 $\pm$ 0,00	23,00 $\pm$ 0,00
<i>S. aureus</i>	15,75 $\pm$ 0,35	18,25 $\pm$ 0,35	6,00 $\pm$ 0,00	18,75 $\pm$ 0,35
<i>K. pneumoniae</i>	17,00 $\pm$ 0,00	39,50 $\pm$ 0,70	6,00 $\pm$ 0,00	16,00 $\pm$ 0,00
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	18,75 $\pm$ 0,35	36,50 $\pm$ 0,00	6,00 $\pm$ 0,00	15,50 $\pm$ 0,70

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



Cs : Colistine, **I** : Imipenème, **P**: Pénicilline, **Ra** : Rifampicine.

Figure 10 : Représentation graphique du test de sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis des quatre antibiotiques (Colistine, Imipenème, Pénicilline, Rifampicine).

D'après l'histogramme représenté dans la figure 10 et le tableau VIII, on constate que toutes les souches bactériennes ont résistées à la pénicilline. Pour le reste des antibiotiques, une hétérogénéité de sensibilité a été remarquée en fonction des souches testées.

Une grande zone d'inhibition a été enregistrée pour l'imipenème chez toutes les souches bactériennes étudiées excepté *S. aureus* et *A. baumannii*. L'imipenème présente sa plus grande zone d'inhibition chez *K. pneumoniae* avec une zone d'inhibition atteignant les 39,50 mm ± 0,70mm, puis *P. aeruginosa* ATCC 27853 avec une zone d'inhibition de 36,50 mm ± 0,00 mm.

La rifampicine présente des zones d'inhibition chez *S. aureus* et *A. baumannii* qui dépassent celles de l'imipenème avec des diamètres de 18,75 ± 0,35 et 23,00 ± 0,00 respectivement, par contre chez les autres souches la zone d'inhibition de la rifampicine est nettement inférieure de celle de l'imipenème.

La sensibilité la moins élevée a été observée avec la rifampicine chez *P. aeruginosa* ATCC 27853 avec une zone d'inhibition de 15,5 mm ± 0,70 mm.

La sensibilité la moins élevée avec la Colistine est marqué chez *A. baumannii* avec une zone d'inhibition de 8,50 ± 0,70 mm.

IV. Résultats de la sensibilité des souches bactériennes aux deux huiles essentielles

IV.1. La sensibilité des bactéries à l'Huile essentielle *Cedrus atlantica*

La figure 11 montre l'effet de l'H.E *Cedrus atlantica* vis-à-vis des quatre souches bactériennes étudiées.

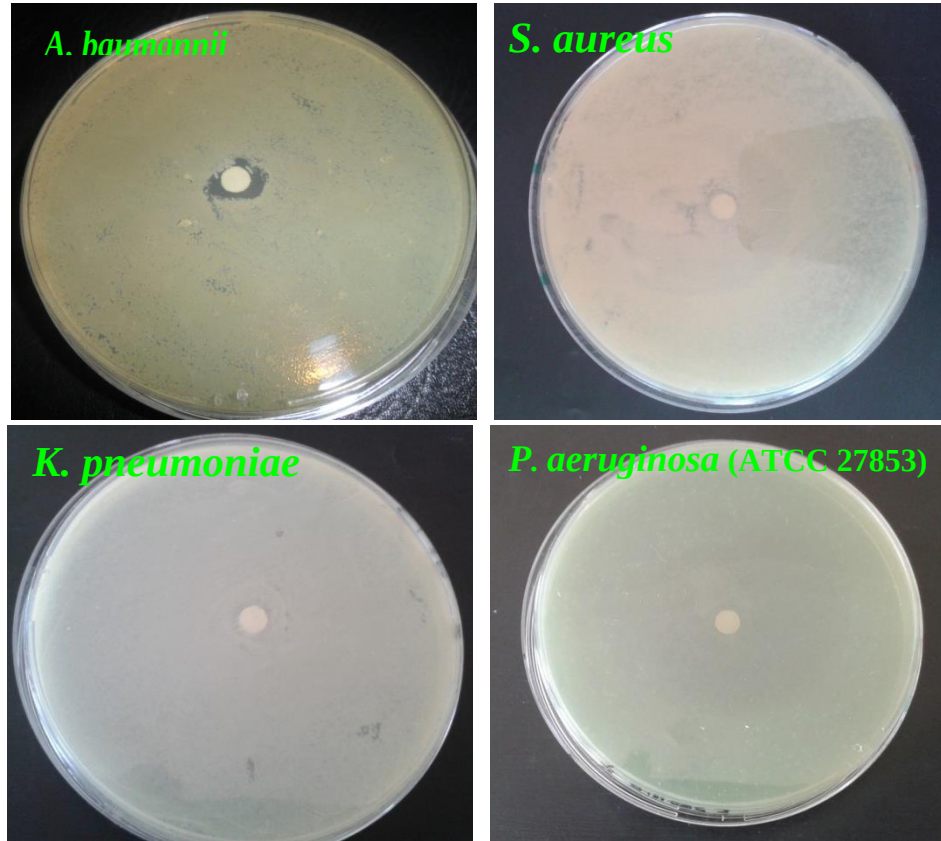


Figure 11 : Effet de l'huile essentielle *Cedrus atlantica* sur les bactéries étudiées.

Nous avons mis en évidence le pouvoir antibactérien de l'huile essentielle *Cedrus atlantica* vis-à-vis de quatre bactéries. Les zones d'inhibition sont indiquées dans le tableau IX.

Tableau IX : Résultats des diamètres des zones d'inhibition en mm (moyenne $\pm$ l'écart type) de l'Huile essentielle de *Cedrus atlantica* sur les quatre souches bactériennes.

souches	<i>Cedrus atlantica</i>	
	Diamètres des zones d'inhibition en (mm) (moyenne des trois essais $\pm$ l'écart type)	Sensibilité
<i>A. baumannii</i>	10,33 $\pm$ 0,28	(+)
<i>S. aureus</i>	7,67 $\pm$ 0,28	(-)
<i>K.pneumoniae</i>	8,00 $\pm$ 0,50	(-)
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	8,00 $\pm$ 0,90	(-)

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

IV.2. La sensibilité des bactéries à l'Huile essentielle *Origanum compactum*

La figure 12 montre l'effet de l'H.E *Origanum compactum* vis-à-vis des quatre souches bactériennes étudiées.

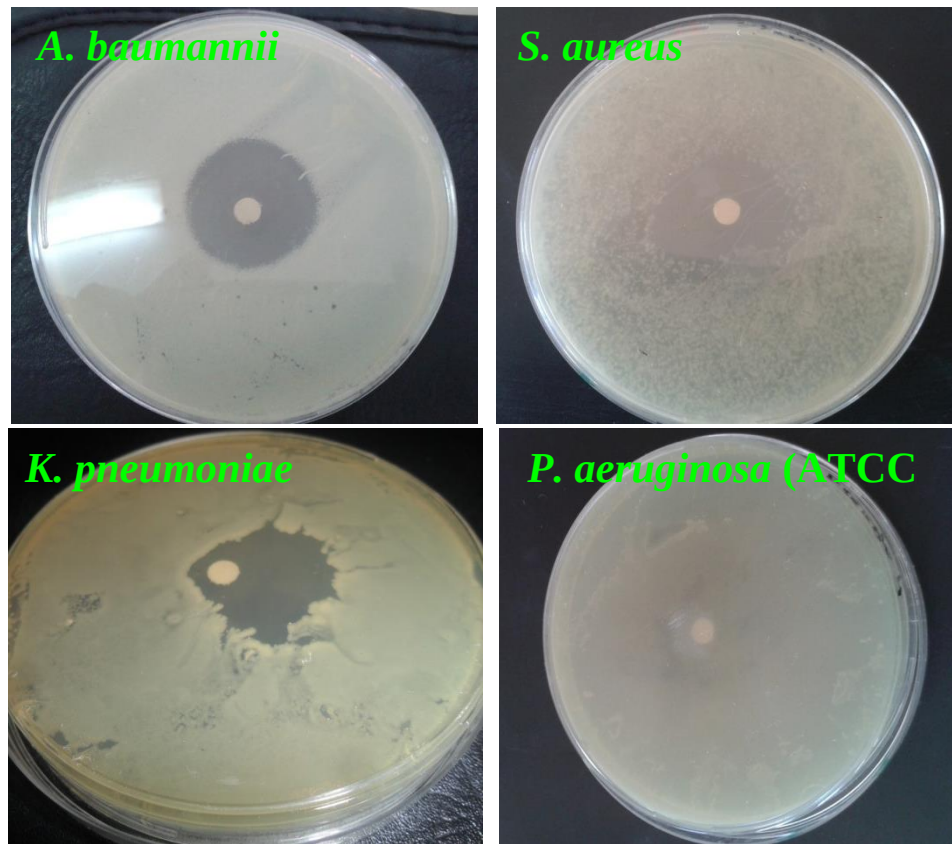


Figure 12 : Effet de l'H.E *Origanum compactum* sur les bactéries étudiées.

Le diamètre des zones d'inhibition ont été mesurés ainsi que la sensibilité des souches bactériennes à l'H.E *Origanum compactum*. Les résultats sont résumés dans le tableau X.

Tableau X : Résultats des diamètres des zones d'inhibition en mm (moyenne $\pm$ l'écart type) de l'H.E *Origanum compactum* sur les quatre souches bactériennes.

souches	<i>Origanum compactum</i>	
	Diamètres d'inhibition en (mm) (moyenne des trois essais $\pm$ l'écart type)	Sensibilité
<i>A. baumannii</i>	28,50 $\pm$ 6,06	(+++)
<i>S. aureus</i>	22,50 $\pm$ 4,44	(+++)
<i>K.pneumoniae</i>	18,67 $\pm$ 4,07	(++)
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	17,50 $\pm$ 5,89	(++)

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

Le tableau XI suivant résume les résultats du test d'aromatogramme obtenus avec les deux huiles essentielles vis-à-vis des quatre souches bactériennes testées.

Tableau XI : Tableau récapitulatif de l'activité antibactérienne des huiles essentielles *Cedrus atlantica* et *Origanum compactum* sur les quatre souches bactériennes.

huile essentielle Souches	Diamètres des zones d'inhibition en (mm) (moyenne $\pm$ l'écart type)			
	<i>Cedrus atlantica</i>		<i>Origanum compactum</i>	
	Diamètre	Sensibilité	Diamètre	Sensibilité
<i>A. baumannii</i>	10,33 $\pm$ 0,28	(+)	28,50 $\pm$ 6,06	(+++)
<i>S. aureus</i>	7,67 $\pm$ 0,28	(-)	22,50 $\pm$ 4,44	(+++)
<i>K.pneumoniae</i>	8,00 $\pm$ 0,50	(-)	18,67 $\pm$ 4,07	(++)
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	8,00 $\pm$ 0,90	(-)	17,50 $\pm$ 5,89	(++)

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

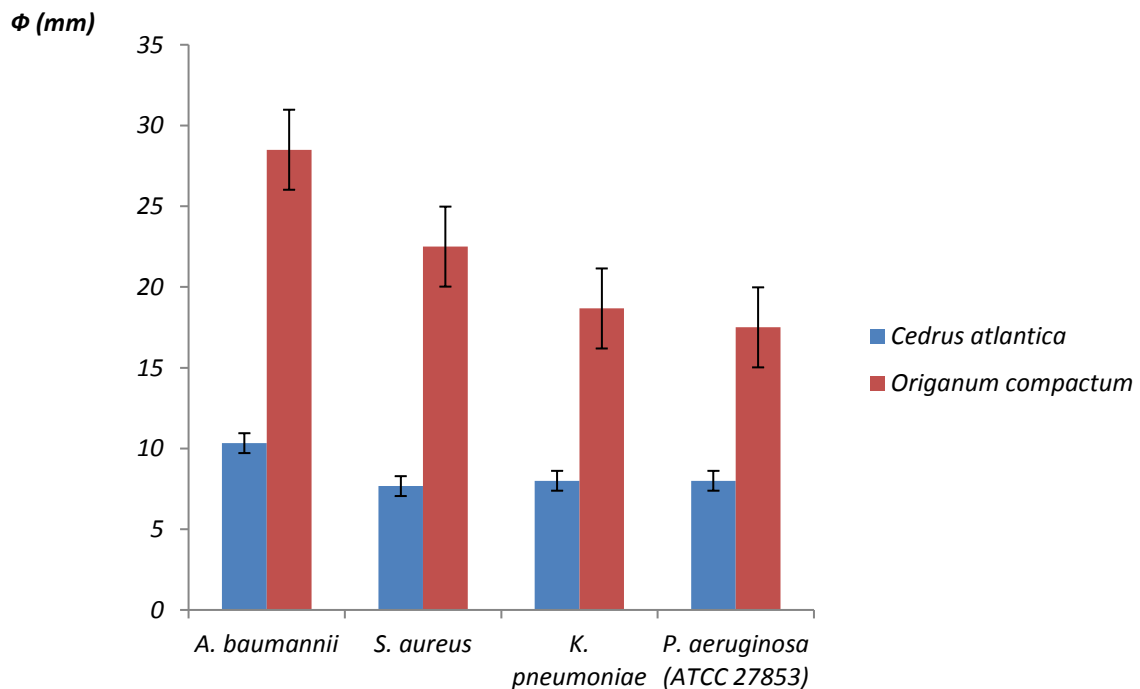


Figure 13 : Représentation graphique des résultats de l'activité antibactérienne des huiles essentielles *Cedrus atlantica* et *Origanum compactum* sur les quatre souches bactériennes étudiées.

D'après le tableau XI et l'histogramme représenté dans la figure 13, nous constatons facilement que l'huile essentielle *Cedrus atlantica* a une faible activité si on la compare avec l'huile essentielle *Origanum compactum* qui par contre a une très bonne activité sur les quatre souches testées.

Malgré l'existence des zones d'inhibition relativement faibles pour l'aromatogramme avec l'H.E *Cedrus atlantica*, nos résultats prouvent l'existence d'une activité antimicrobienne contre les souches bactériennes testées, qui sont des microbes pathogènes impliqués dans des maladies nosocomiales (*A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* ATCC 27853) et des intoxications alimentaires (dans le cas de *S. aureus*).

Acinetobacter baumannii est la souche la plus sensible aux deux H.Es avec une zone d'inhibition de 10,33 mm pour l'huile *Cedrus atlantica*, et 28,50 mm pour l'huile essentielle *Origanum compactum* elle est donc extrêmement sensible à cette dernière).

La bactérie à gram positif testée, *Staphylococcus aureus* est la souche la plus résistante à l'huile essentielle *Cedrus atlantica* avec un diamètre de 7,67 mm, mais extrêmement sensible à l'H.E *Origanum compactum* avec un diamètre de 22,5 mm.

Klebsiella pneumoniae et *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) sont sensible à l'huile essentielle *Cedrus atlantica*. Et très sensible à l'H.E *Origanum compactum* avec des zones d'inhibition de 18,67 mm et 17,5 mm respectivement.

La méthode de diffusion des disques nous a permis de mettre en évidence l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Cedrus atlantica* et d'*Origanum compactum* vis-à-vis des quatre souches testées.

L'analyse de la variance a montré que l'activité de l'huile essentielle *Cedrus atlantica* sur les quatre bactéries testées présente des différences significatives ($P= 0,0012$), ce qui explique que les moyennes sont différentes donc les bactéries ne répondent pas de la même manière à l'huile essentielle *Cedrus atlantica* (tableau I, annexe II). Cette analyse a montré qu'il existe au moins une moyenne différente, le test complémentaire Newman Keuls a révélé que c'est la bactérie *Acinetobacter baumannii* qui présente une différence par rapport aux autres bactéries (tableau II et III, annexe II).

L'analyse de la variance a montré que l'activité de l'huile essentielle *Origanum compactum* sur les quatre bactéries testées présente des différences non significatives ($P= 0,11$),

ce qui explique que les moyennes sont similaires donc les bactéries répondent de la même manière à l'huile essentielle *Origanum compactum* (tableau IV, annexe II).

Les travaux de **ZENG *et al.* (2012 a)** sur l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle provenant des aiguilles de pin de *Cedrus deodara* ont montré une inhibition significative contre les bactéries testées (*E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis* et *B. cereus*) avec des diamètres des zones d'inhibition allant de 17,1 à 18,17 mm.

ZENG *et al.* (2012 b), ont mené une étude sur l'activité antibactérienne de l'extrait hydrosoluble provenant d'aiguilles de pin de *Cedrus deodara* sur des bactéries Gram négatif (*E. coli*, *P. vulgaris*) et des bactéries Gram positif (*S. aureus*, *B. subtilis* et *B. cereus*) cette activité antibactérienne a été évaluée qualitativement et quantitativement par des zones d'inhibition. Cette étude a montré un effet inhibiteur puissant contre toutes les bactéries testées avec un diamètre de zones d'inhibition allant de 16,5 à 26,5 mm. Cet extrait provenant de *Cedrus deodara* a montré un effet inhibiteur élevé sur *S. aureus*, *B. subtilis* et *B. cereus* avec le diamètre des zones d'inhibition de 26,5 ; 21,2 et 21,5 mm. Ainsi, les bactéries Gram positif semblent être plus sensibles que les bactéries Gram négatif.

Une étude menée par **YAN-QIU *et al.* (2008)**, a montré que les bactéries Gram positif étaient plus sensibles que les bactéries Gram négatif vis-à-vis de l'huile essentielle de *Cedrus deodara*

Toutes les études effectuées par ces auteurs sur les huiles essentielles du genre *Cedrus* ne concordent pas avec nos résultats pour l'huile essentielle *Cedrus atlantica*, qui présente une faible activité avec des zones d'inhibition allant de 7,67 à 10,33 mm.

DERWICH *et al.* (2010), ont mené une étude pour déterminer l'activité antibactérienne de l'huile essentielle *Cedrus atlantica* croissant au Maroc sur des bactéries Gram négatif (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*) et des bactéries Gram positif (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus sphericus* et *Staphylococcus intermedius*) en utilisant l'aromatogramme. Les résultats ont montré que la zone d'inhibition la plus forte est de 12 à 25 mm et 6 à 22 mm pour les bactéries gram négatif et Gram positives, respectivement. Notre résultat obtenu avec *Staphylococcus aureus* (Gram +) concorde avec ces travaux avec une zone d'inhibition de 7,67 mm. En revanche, les bactéries Gram négatives testées n'ont pas donné des résultats similaires à cette étude avec un diamètre d'inhibition compris entre 8 et 10,33 mm.

Une étude menée par **DAKIR et al. (2013)**, a révélé une activité significative de *Cedrus atlantica* contre *Bacillus cereus*, *Streptococcus* du groupe C, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* et *Proteus vulgaris*, par contre elle s'est avérée inefficace chez *Pseudomonas aeruginosa*. Cette étude correspond à notre résultat concernant la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) qui présente une sensibilité minimale vis-à-vis de *Cedrus atlantica* avec une zone d'inhibition de 8 mm.

Notre étude concorde avec le travail réalisé par **ZRIRA et GHANMI, (2016)** qui ont démontré une faible efficacité de *Cedrus atlantica* contre *Staphylococcus aureus*.

L'huile essentielle *Cedrus atlantica* n'a pas montré une activité antibactérienne intéressante vis-à-vis des bactéries testées dans notre étude. Des résultats similaires ont été trouvés par **GHAFOURI et al. (2014)**, qui notent que l'huile essentielle *Cedrus atlantica* a exercé une faible activité bactéricide contre les bactéries testées à savoir *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* et *Staphylococcus aureus*. Cela est dû à son profil chimique riche en hydrocarbures terpène et pauvre en phénols terpène.

Contrairement au cèdre de l'Atlas, l'huile essentielle d'*Origanum compactum* a montré une efficacité contre toutes les espèces bactériennes testées à savoir *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) avec des zones d'inhibition entre 17,5 à 28,5 mm. La bactérie Gram + s'est avérée plus sensible par rapport aux bactéries Gram -, excepté *Acinetobacter baumannii* avec la plus grande zone d'inhibition (28,5 mm).

L'étude menée par **BENDAHOU et al. (2008)**, sur l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* vis-à-vis de trois bactéries Gram positif (*B. subtilis*, *S. aureus* et *Listeria monocytogenes*) et cinq bactéries Gram négatif (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *C. freundii* et *S. typhimurium*) a révélé que l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* a exercé une forte activité sur les bactéries *E. coli*, *S. aureus* et *S. typhimurium* avec des zones d'inhibition mesurées à 24-27 mm, 23-24 mm et 25-26 mm, respectivement. En revanche *P. aeruginosa* et *K. pneumoniae* étaient les plus résistantes. Ce travail est en accord avec nos résultats avec des diamètres des zones d'inhibition de 17,50 et 18,67 pour *P. aeruginosa* et *K. pneumoniae*, respectivement.

ESEN et al. (2007), ont mené une étude sur l'activité antimicrobienne des plantes sauvages et cultivées d'*Origanum vulgare* de la région de Marmara (Turquie) vis-à-vis de cinq

bactéries (*E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. aerogenes*, *P. vulgaris*). Ce travail a révélé que l'huile essentielle possède les propriétés antibactériennes les plus fortes contre les bactéries testées, cette activité est contrôlée par la composition chimique de l'huile essentielle riche en composés phénoliques, tels que le carvacrol et le thymol.

Une autre étude menée par **DORTUNC et CEVIKBAS (1992)** a indiqué que toutes les bactéries testées étaient sensibles à l'huile essentielle. En outre, aucune différence évidente dans la sensibilité entre les bactéries Gram négatif et bactéries Gram positif n'a été mesurée après 24h d'incubation. Ils ont aussi montré que les huiles essentielles d'*Origanum onitiles* et *Origanum vulgare* étaient efficaces contre *B. subtilis*, *S. aureus* et *E. coli*.

Une étude menée par **SARI et al. (2006)**, sur l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de plusieurs populations d'*Origanum glandulosum* Algérien a révélé que toutes les huiles essentielles étaient inhibantes de la croissance de toutes les souches bactériennes testées à savoir *E. coli*, *S. aureus* et *P. aeruginosa*. Les propriétés antibactériennes des huiles essentielles ont été attribuées à la présence de composants phénoliques à savoir le thymol et le carvacrol, qui semblent rendre la membrane cellulaire perméable.

Selon **CONSENTINO et al. (1999)**, l'activité antibactérienne des huiles essentielles de plusieurs plantes médicinales sont apparemment liées à leur contenu phénolique

Il convient de souligner que nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par d'autres auteurs concernant la sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis de l'huile essentielle d'*Origanum*.

Nos résultats obtenus pour l'activité antibactérienne d'*Origanum compactum* semblent en accord avec ceux rapportés par **BOUHDID et al. (2008)**, où l'huile essentielle *Origanum compactum* était remarquablement active contre toutes les souches testées (*S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* et *Listeria innocua*), à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa* qui a montré une résistance.

BOUYAHYA et al. (2017), ont mené une étude sur l'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits d'*Origanum compactum* par la méthode de diffusion en puits. Tous les extraits sont révélés capables d'inhiber les souches bactériennes testées à savoir les Gram + (*Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes*) et les Gram - (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*) avec une zone d'inhibition la plus élevée de l'ordre de $34 \pm 1,24$ mm.

Cette activité antibactérienne de l'H.E d'*Origanum compactum* est corrélée avec sa forte teneur en carvacrol et thymol (30,53% et 27,5%) respectivement. Ces composés phénoliques sont parmi les agents antibactériens les plus efficaces connus à ce jour (**NAZER *et al.*, 2005**). Plusieurs études ont démontré que le carvacrol et thymol sont capables d'inactiver les souches bactériennes dans les milieux synthétiques ainsi que sur une matrice alimentaire (**LAMBERT *et al.*, 2001 ; KNOWLES *et al.*, 2005 ; VALERO et FRANCES, 2006**).

D'après **ULTEE *et al.* (2002)**, l'activité antimicrobienne des huiles essentielles peut être due à la présence d'une synergie entre les composants principaux et les autres constituants des huiles conduisant à divers degrés d'activité antimicrobienne.

En somme, d'après nos résultats sur l'activité antibactérienne des deux huiles essentielles testées, il en ressort que l'activité biologique d'une huile essentielle est à mettre 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 (**LAIB, 2012**). Selon **KALEMBA et KUNICKA, (2003)**, la sensibilité d'un microorganisme à l'huile essentielle dépend des propriétés de cette dernière et de la résistance du microorganisme.

La faible efficacité de l'huile essentielle de *Cedrus atlantica* est due probablement aux pertes des composés volatils de l'huile essentielle ou à la constitution de la paroi des Gram négatif riche en lipides. Selon **INOUYE *et al.* (2001)**, la résistance des bactéries Gram négatif est attribuée au caractère hydrophile de leur membrane qui bloque la pénétration des molécules hydrophobiques telles que les polyphénols.

V. Résultats des concentrations minimales inhibitrices réalisées avec l'huile essentielle *Origanum compactum*

Les résultats de la CMI réalisé sur les souches *Acinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) sont représentés dans la figure 14 et figure 15.

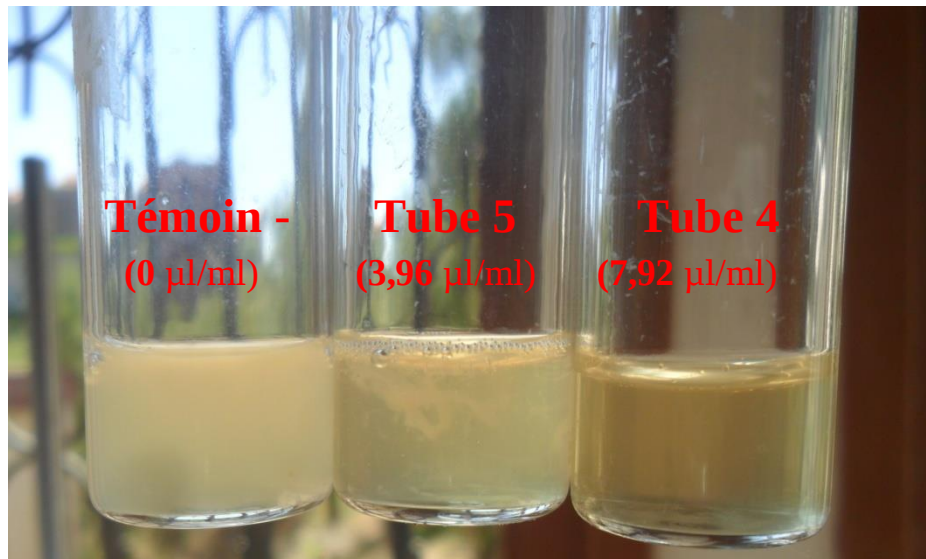


Figure 14 : Résultat de la CMI réalisé avec l'H.E *Origanum compactum* sur *A. baumannii*.

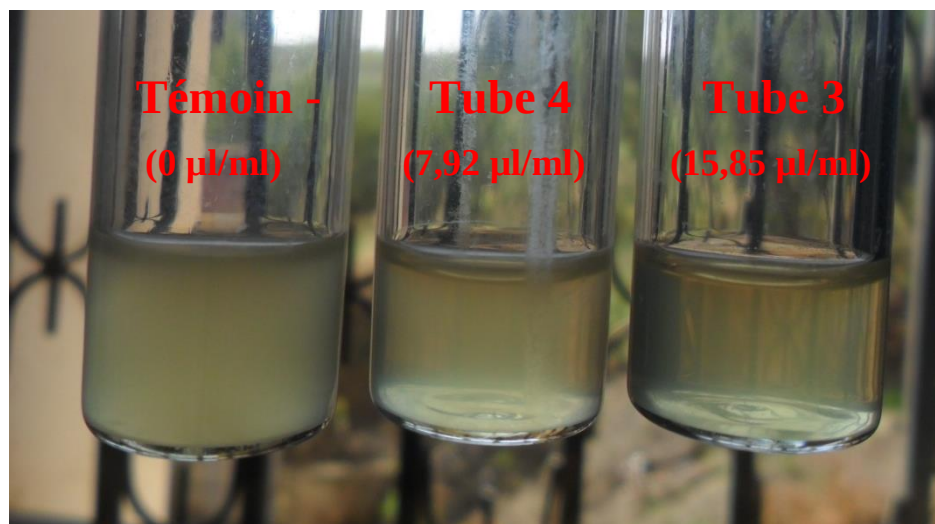
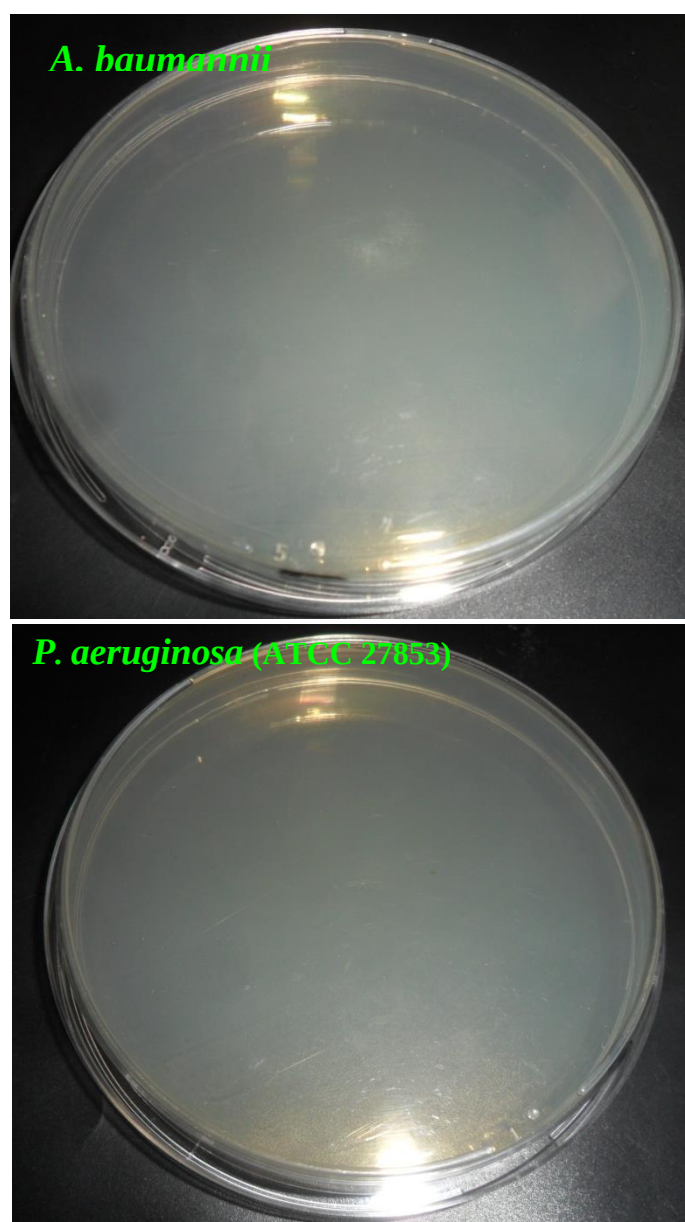


Figure 15 : Résultat de la CMI réalisé avec l'H.E *Origanum compactum* sur *P. aeruginosa* (ATCC 27853).

Les valeurs des CMIs de l'H.E *Origanum compactum* vis-à-vis des bactéries *A. baumannii* et *P. aeruginosa* sont résumés dans le tableau XII.

Tableau XII : Valeur des CMI de *Origanum compactum* des deux souches testées (µl/ml).

Bactéries	Concentration minimale inhibitrice
<i>A. baumannii</i>	7,92 µl/ml
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	15,85 µl/ml

**Figure 16 :** Résultats de l'action inhibitrice de l'H.E *Origanum compactum* sur les souches (*A. baumannii* et *P. aeruginosa* ATCC 27853).

Les résultats obtenus montrent une présence de croissance faible par rapport au témoin (-). En se référant au tableau XII et aux figures 14 et 15, nous constatons que *A. baumannii* qui a été la plus sensible à l'huile essentielle *Origanum compactum* elle a été inhibée totalement à la dilution 6,25% qui correspond à la concentration 7,92 µl/ml. Par contre *P. aeruginosa* (ATCC 27853) a été inhibé à la dilution 12,5% qui correspond à la concentration 15,85 µl/ml.

Les cultures réalisées à partir des CMI des deux souches bactériennes ont révélées une action bactéricide de l'H.E *Origanum compactum* (figure 16).

Une inhibition totale a été obtenue avec l'huile essentielle d'*Origanum compactum* à la concentration de 4 ppm (0,004 µl/ml) sur toutes les espèces microbiennes testées à savoir *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, etc (CHARAI *et al.*, 2011).

SBAYOU *et al.* (2014) ont montré l'efficacité de l'huile essentielle d'*Origanum compactum* contre les bactéries d'origine alimentaire, et ont déterminé les valeurs de la CMI entre 0,3125 et 0,625 µL/ml pour *Salmonella* spp.

Il est bien de signaler que l'activité antibactérienne de cette huile essentielle peut être attribuée à la présence d'une forte concentration de carvacrol qui est reconnu pour sa grande activité antimicrobienne (LAMBERT *et al.*, 2001 ; BEN ARFA *et al.*, 2006 ; CHAMI *et al.*, 2004 ; VELDHUIZEN *et al.*, 2006). L'activité antibactérienne des extraits est étroitement associée à leur contenu phénolique (SHAN *et al.*, 2007).

L'huile essentielle d'*Origanum compactum* a été suggérée pour avoir une activité antimicrobienne puissante, due à ses constituants phénolique, alcoolique et terpénoïde (BARRATA *et al.*, 1998)

VI. Activité antifongique de l'huile essentielle *Origanum compctum*

VI.1. Résultats des témoins négatifs



Figure 17 : Résultats de culture du champignon *B. cinerea* après 9 jours d'incubation.

VI.2. Résultats des témoins positifs

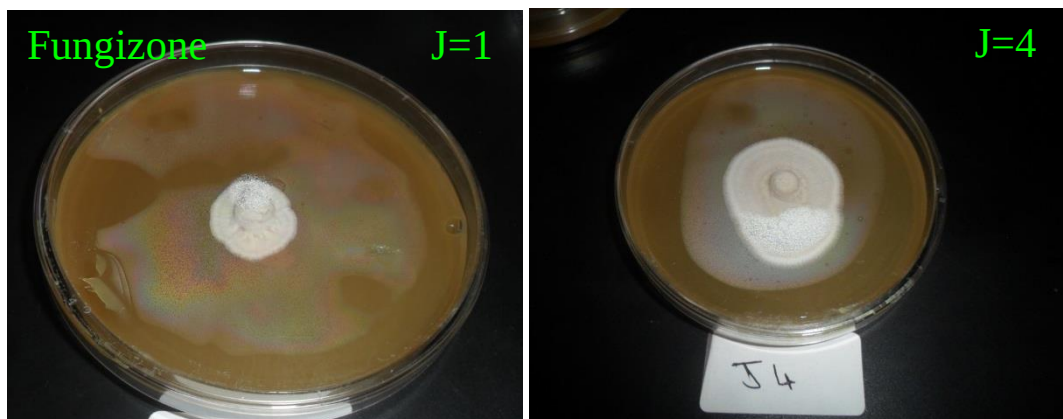


Figure 18 : Résultats de l'effet fongistatique de 15 μ l du gungizone sur *B. cinerea* après 9 jours d'incubation à 25°C.

VI.3. Résultats du test de sensibilité de la souche fongique *Botrytis cinerea* à l'huile essentielle d'*Origanum compactum*

VI.3.1. Méthode de contact direct

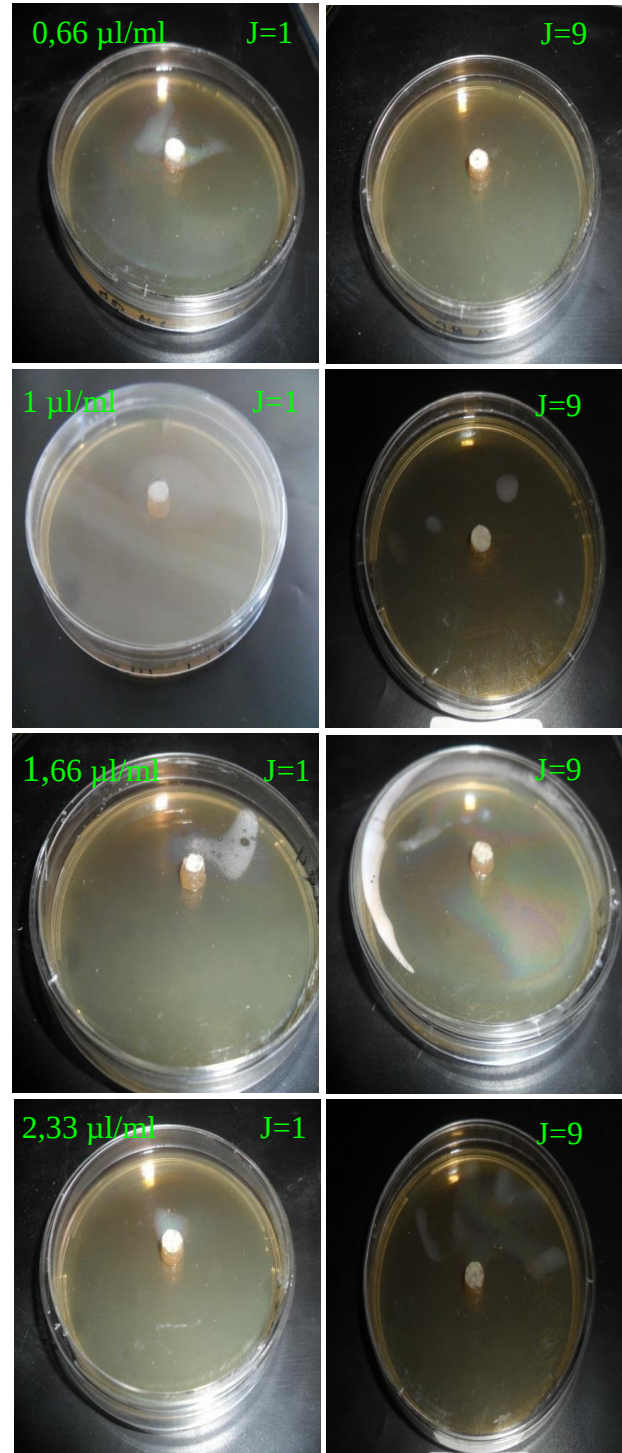


Figure 19 : Effet inhibiteur de l'huile essentielle d'*Origanum compactum* à différentes concentrations, vis-à-vis de la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea*, après 9 jours d'incubation à 25°C.

Le tableau XIII résume les résultats de l'activité antifongique de l'huile essentielle d'*Origanum compactum* aux différentes concentrations, par la méthode de contact direct en fonction du temps d'incubation.

Tableau XIII : Activité antifongique de l'huile essentielle d'*Origanum compactum* sur *Botrytis cinerea* par la méthode de contact direct exprimée par la croissance mycélienne en mm (moyenne $\pm$ écart type).

Jour	Concentration de l'huile essentielle				fungizone	Témoin négatif
	0,66 μ l/ml	1 μ l/ml	1,66 μ l/ml	2,33 μ l/ml		
1	6,00 $\pm$ 0,00	6,00 $\pm$ 0,00	6,00 $\pm$ 0,00	6,00 $\pm$ 0,00	20,00 $\pm$ 1,41	39,50 $\pm$ 7,77
2	6,00 $\pm$ 0,00	6,00 $\pm$ 0,00	6,00 $\pm$ 0,00	6,00 $\pm$ 0,00	29,00 $\pm$ 0,00	41,00 $\pm$ 6,24
3	6,00 $\pm$ 0,00	6,00 $\pm$ 0,00	6,00 $\pm$ 0,00	6,00 $\pm$ 0,00	37,50 $\pm$ 4,94	50,66 $\pm$ 2,51
9	6,00 $\pm$ 0,00	6,00 $\pm$ 0,00	6,00 $\pm$ 0,00	6,00 $\pm$ 0,00	39,00 $\pm$ 2,82	57,50 $\pm$ 7,77

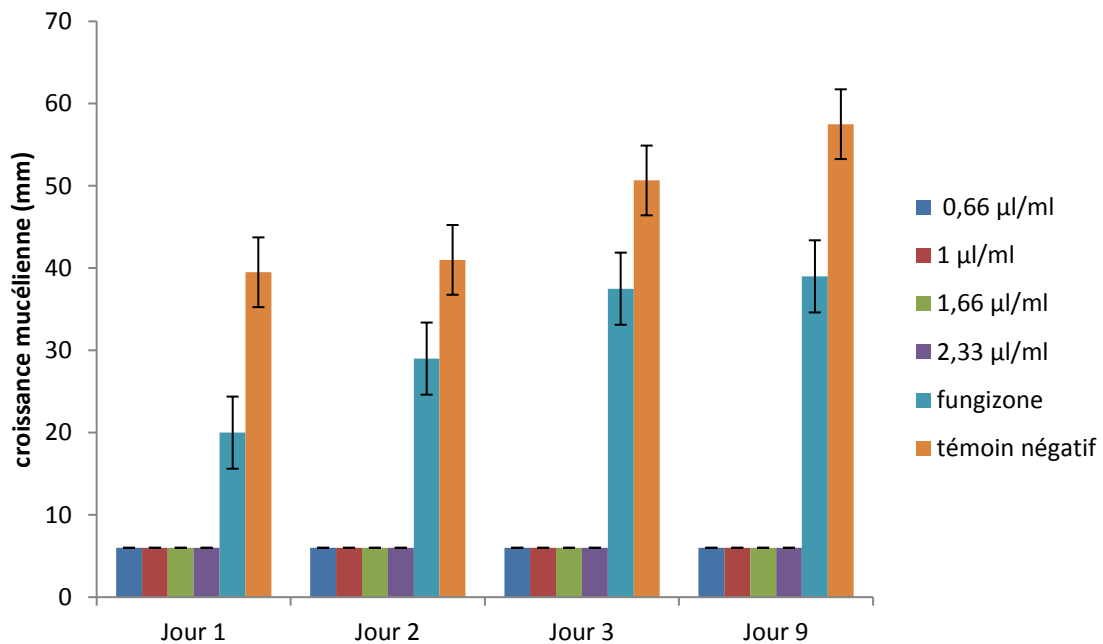


Figure 20 : croissance mycélienne de *B. cinerea* en fonction du nombre de jours d'incubation et de la concentration de l'H.E d'*Origanum compactum*, comparée aux témoins

D'après l'histogramme, on constate que le champignon *B. cinerea* manifeste une sensibilité vis-à-vis de l'huile essentielle d'*Origanum compactum*. On constate une diminution de croissance du champignon comparé aux témoins.

VI.3.2. Méthode de contact indirect

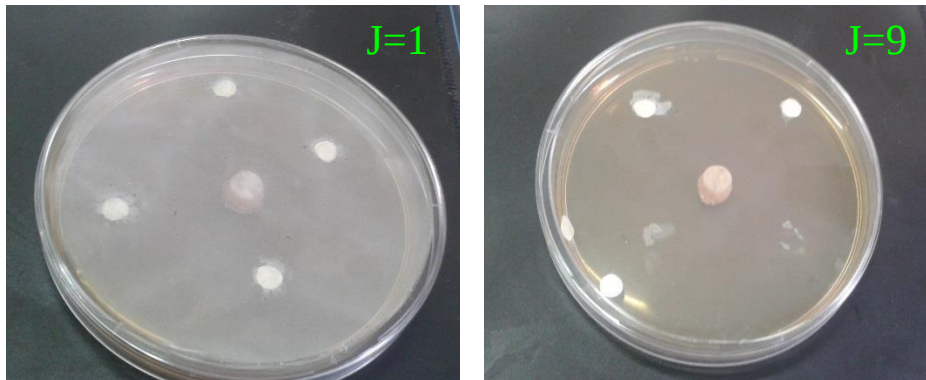


Figure 21 : Effet inhibiteur de l'huile essentielle d'*Origanum compactum* par contact indirect vis-à-vis de la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea*, après 9 jours d'incubation à 25°C.

Le tableau XIV résume les résultats de l'activité antifongique de l'huile essentielle d'*Origanum compactum* par la méthode de contact indirect en fonction du temps d'incubation.

Tableau XIV : Activité antifongique de l'huile essentielle d'*Origanum compactum* sur *Botrytis cinerea* par la méthode de contact indirect exprimée par la croissance mycélienne en mm (moyenne $\pm$ écart type).

Jours	<i>Origanum compactum</i>	Témoin négatif
1	6,00 $\pm$ 0,00	39,50 $\pm$ 7,77
2	6,00 $\pm$ 0,00	43,50 $\pm$ 6,36
3	6,00 $\pm$ 0,00	50,50 $\pm$ 3,53
9	6,00 $\pm$ 0,00	57,50 $\pm$ 7,77

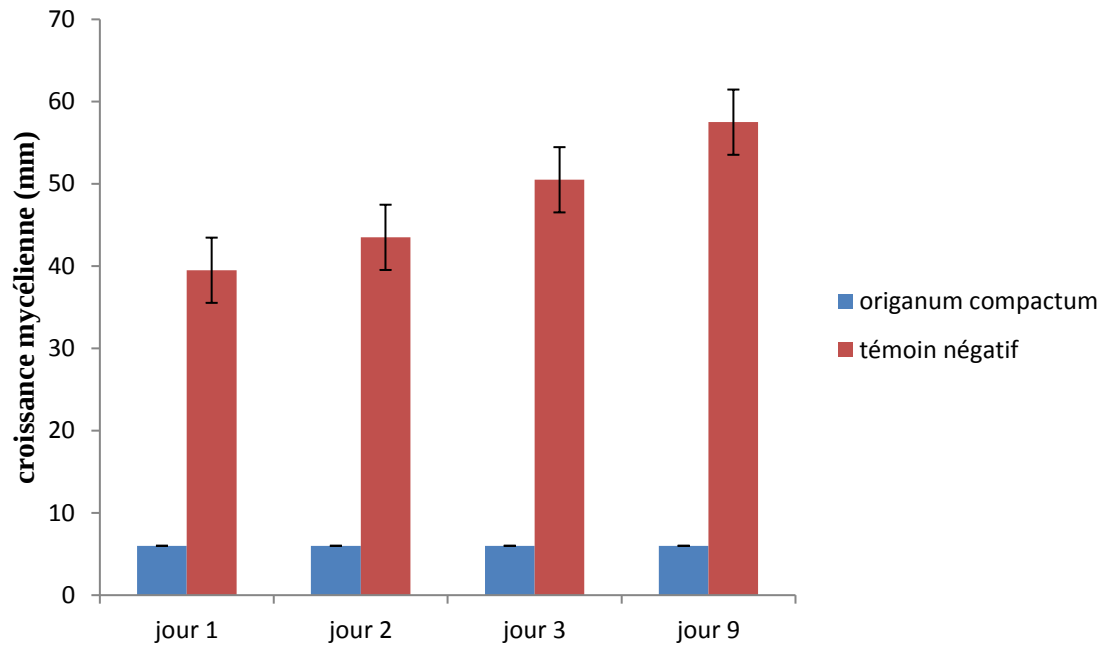


Figure 22 : Croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* en fonction du nombre de jours.

D'après les résultats du tableau XIV et l'histogramme représenté dans la figure 22, on constate que l'huile essentielle d'*Origanum compactum* utilisée en contact indirect inhibe la croissance du champignon *Botrytis cinerea*.

VI.4. Evaluation du pourcentage d'inhibition de l'huile essentielle *Origanum compactum* testée sur *Botrytis cinerea*

Les indices antifongiques de l'huile essentielle *Origanum compactum* aux concentrations testées ont été déterminés par la formule décrite par **WANG et al. (2005)** indiquée dans la partie expérimentale. Les résultats sont récapitulés dans le tableau XV.

Tableau XV : Les indices antifongique de l'huile essentielle *Origanum compactum*.

Jours	<i>Origanum compactum</i>	Fungizone
1	84,81±0,00%	70,00±0,00%
2	85,36±0,00%	70,15±0,21%
3	88,15±0,00%	78,84±2,84%
9	89,56±0,00%	83,58±2,51%

D'une manière générale, la diminution de la croissance de la souche fongique de *Botrytis cinerea* en présence de différentes concentrations de l'huile essentielle d'*Origanum compactum* comparée aux témoins pourrait s'expliquer par la présence dans ces huiles essentielles des composés à activité antifongique.

L'huile essentielle d'*Origanum compactum* a ralenti la croissance de *Botrytis cinerea*. Cette inhibition se traduit par la sensibilité de la souche fongique à cette huile avec un taux d'inhibition de l'ordre de 89,56% au neuvième (9) jour d'incubation et cela pour toutes les concentrations.

KOUL et al. (2008) ont prouvé que l'application continue des fongicides synthétiques pourrait provoquer une résistance mycélienne, mais il est probable que cette résistance se développera plus lentement lors de l'application des H.Es biologiques en raison de ses différents composants chimiques qui les caractérisent.

Les huiles essentielles ont été évaluées contre plusieurs espèces de champignons, y compris les souches pathogènes pour les humains et les plantes, et il a été démontré qu'elles sont souvent fongicides (**BAJPAI et al., 2008**).

L'activité des huiles essentielles a été démontrée à la fois contre les champignons pathogènes causant les mycoses (**ADAM et al., 1998 ; CAVALEIRO et al., 2006**) et contre les champignons provoquant des détériorations des aliments et produisant des mycotoxines (**NGUEFAK et al., 2004**).

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles ainsi que leur mode d'action sont directement influencés par la nature et la proportion de leurs constituants qui entrent dans leur composition. Les composés majoritaires sont souvent responsables de l'activité antibactérienne observée (**DORMANS et DEANS, 2000 ; KALEMBA et KUNICKA, 2003**).

L'efficacité des huiles essentielles dans le contrôle des champignons pathogènes peut être en raison d'une synergie entre leur composants (**TRIPATHI et DUBEY, 2004**). Donc la composition chimique des huiles essentielles est un facteur essentiel pour leurs activités (**CAROVIC-STANKA et al., 2010**).

L'analyse chromatographique en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) de l'huile essentielle *Origanum compactum* montre la présence de 32 constituants.

Le carvacrol (30,53%), le thymol (27,50%) et son précurseur γ -terpinène (18,20%) sont les principaux composants (**BOUHDID et al., 2008**).

Les résultats de **BEN HAMMOU et al. (2011)** ont aussi montré que le composé le plus abondant dans la composition chimique de cette huile essentielle est le carvacrol (36.31%), suivi par le thymol (16.88%), p-cymène (9.21%). Autre composés aussi présents avec un faible pourcentage tel que α -terpinene (2.33%), isocaryophyllene (2.01%), et linalol (1.35%) sont trouvés en petites concentrations.

Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés dans les études précédentes. Les monoterpènes aromatiques principalement présentés dans le genre *Origanum* sont : p-cymène, le thymol, carvacrol et leur précurseur γ -terpinène (**SKOULA et al., 1999**).

D'autres recherches ont montré que l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de l'espèce *Origanum* est souvent attribuée à ses composantes aromatique, le carvacrol, le thymol et le p-cymène (**DAOUK et al., 1995 ; MULLER-RIEBAU et al., 1995 ; SOKOVIC et al., 2002 ; BOUCHRA et al., 2003 ; DAFERERA et al., 2003 ; SOKMEN et al., 2004 ; SOYLU et al., 2006 ; ESEN et al., 2007 ; BENDAHOU et al., 2008**).

L'étude de **NERI et al. (2007)** soutient ces recherches en montrant que le thymol et le carvacrol possèdent des activités antimicrobiennes.

Il est intéressant de noter que le champignon *Botrytis cinerea* est sensible au carvacrol et au thymol (**ARRAS et USAI, 2001**). Il a également été démontré que d'autres espèces de *Thymus* et *Origanum* comme *Thymus capitatus*, *Thymus zygis* et *Origanum syriacum* ont montré une excellente activités antifongiques contre *Botrytis cinerea* (**CUTLER et al., 1996 ; ARRAS et USAI, 2001**).

Certains agents antimicrobiens détruisent la membrane plasmique de manière irréversible conduisant ainsi à la mort cellulaire par un processus lytique (**DENYER et Hugo, 1991 ; HAMOUDA et BAKER, 2000 ; SONG et KIM, 2003 ; RAZZAGHI-ABYANEH et al., 2006**). Les huiles essentielles d'origan, génèrent des effets similaires (**HORNE et al., 2001**). **THOMPSON (1996)**, a démontré que le carvacrol à le même mécanisme d'action vis-à-vis du pathogène.

On peut aussi citer les observations en microscope électronique à transmission réalisé par **FRANCHOMME (1981)**, qui montrent une désorganisation de l'enveloppe des cellules microbiennes sous effet de certaines H.Es riches en molécules portant un groupement phénol (*Origanum compactum*).

Les composants hydrophobes des huiles essentielles peuvent augmenter la perméabilité de la membrane cellulaire, en provoquant la fuite du contenu de cellules bactériennes et fongiques (**COX *et al.*, 2000 ; BURT, 2004 ; CRISTANI *et al.*, 2007**). Le α -terpinène et le limonène affectent la perméabilité de la membrane cytoplasmique de *Candida tropicalis* entraînant la perte des composants cytoplasmiques de la cellule (**ADEGOKE *et al.*, 2000**).

Le mode d'action des H.Es contre les levures pourraient être dû également à l'affaiblissement des processus enzymatiques impliqués dans la production énergétique et la synthèse de composés structuraux (**CONNER et BEUCHAT, 1984**). Les constituants majeurs de l'huile essentielle, peuvent inhiber l'activité respiratoire dans les cellules intactes des levures et dans les mitochondries isolées (**URIBE *et al.*, 1985**).

D'autres études ont montré que le modes d'actions des H.Es semble être lié à un dommage dans la membrane des cellules fongiques, entraînant une altération des biosynthèses de l'ergostérol (**KHOSROVI *et al.*, 2011 ; PINTO *et al.*, 2006 ; POZZATTI *et al.*, 2010**).

L'effet inhibiteur de l'H.E peut être attribué à l'accumulation de ses composés volatils dans le mycélium, suivi d'une interaction avec la partie hydrophobe de la membrane cellulaire, nuisant à sa sélectivité (**LAIRD et PHILLIPS, 2012**).

Certains chercheurs affirment que cet effet inhibiteur est également lié à des changements morphologiques des hyphes en raison de la pénétration des composés actifs de l'H.E dans la membrane plasmique (**KURT et SOYLU, 2010**).

DOBRE *et al.* (2011) ont déclaré que les composés volatils des H.Es sont capables d'inhiber non seulement la croissance mycélienne, mais aussi la germination des spores.

VI.5. Résultats de l'application de l'huile essentielle *Origanum compactum* sur la matrice alimentaire

Test *in vivo* qui consiste en l'application de l'huile essentielle d'*Origanum compactum* par la méthode dite par contact indirect sur des tomates contaminées par *Botrytis cinerea*. Les barquettes ont été incubées à 4 °C.

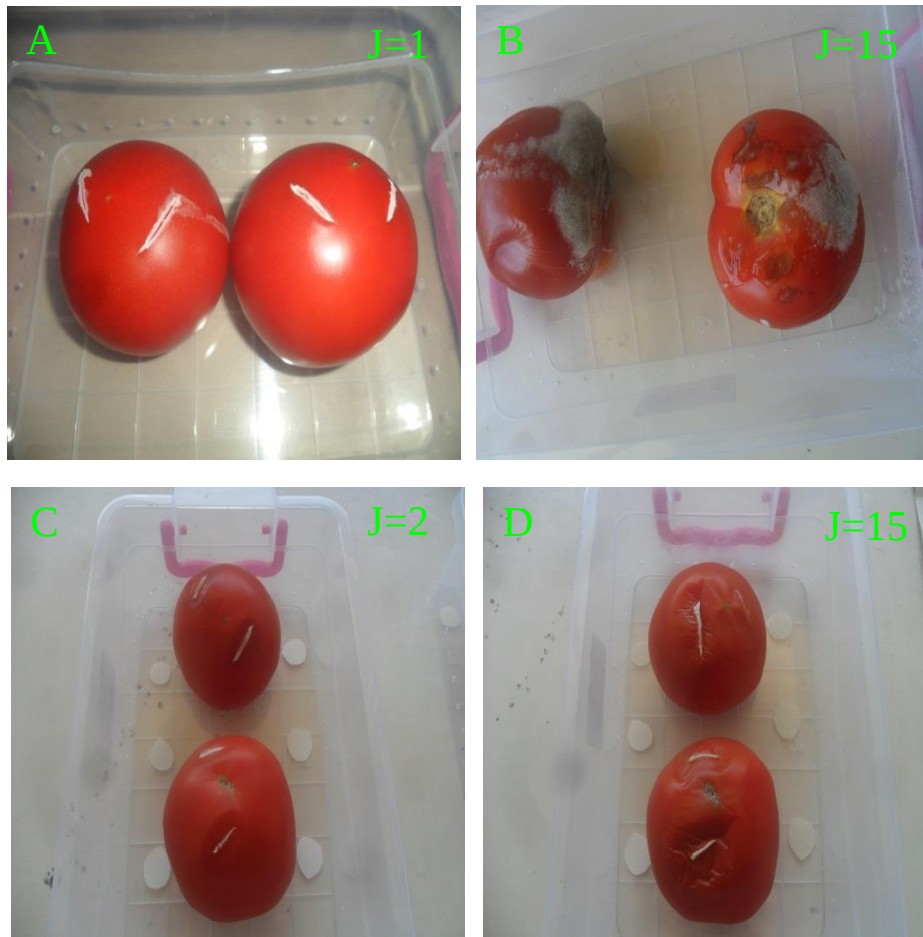


Figure 23 : Résultats de l'application de l'huile essentielle d'*Origanum compactum* sur la tomate par contact indirect, après 15 jours d'incubation à 4°C.

Avec :

A : Tomates contaminées avec *Botrytis cinerea* après 24h d'incubation ;

B : Tomates contaminées avec *Botrytis cinerea* après 15 jours d'incubation ;

C : Tomates contaminées avec *Botrytis cinerea* et traitées avec l'huile essentielle d'*Origanum compactum* après 48h d'incubation ;

D : Tomates contaminées avec *Botrytis cinerea* et traitées avec l'huile essentielle d'*Origanum compactum* après 15 jours d'incubation.

Visiblement, le diamètre de croissance de la moisissure est élevé pour la tomate contaminée avec *B.cinerea* sans traitement avec l'H.E dans les conditions de stockage à une température de 4°C. Alors que lors de l'application de l'H .E par la méthode dite par contact indirect sur les tomates contaminées, le diamètre de croissance de la moisissure est moins élevé.

Le but de ce travail, était de montrer les aspects scientifiques concernant l'application des huiles essentielles pour la conservation alimentaire. L'application de l'huile essentielle de l'*Origanum compactum* par contacte indirect a permis la prolongation de la durée de conservations des tomates jusqu'à 15 jours comparé aux tomates non traitées avec notre huile.

Les huiles essentielles commercialisées dans le monde sont destinées à quatre grands secteurs industriels : parfumerie cosmétique ; parfumerie technique (savons, détergents) ; alimentation et médecine (médecine douce et pharmaceutique) (**GRYSOLE, 2005**).

Les huiles essentielles possèdent des profils de composition chimique différents. Elles sont utilisées comme agents naturels de conservation des aliments. Leur utilisation comme agents de conservation est due à la présence de composés ayant des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes (**CONNER, 1993 ; HAMMER et al., 1999**).

L'industrie alimentaire utilise les huiles essentielles pour rehausser le goût, aromatiser et colorer les aliments (**APROTOSOAIE et al., 2010**). D'autre part, les huiles essentielles possèdent des profils de composition chimique différents permettant de les utiliser comme agents naturels de conservation des aliments (**HOLLEY et al., 2005**).

Cela a déjà été rapporté par l'étude **ZAMBONELLI et al. (2004)**, disant que les huiles essentielles et leurs principes actifs peuvent être utilisés en tant qu'agent de protection contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes abordant les produits alimentaires.

Certaines huiles essentielles extraites de plantes méditerranéennes ont démontré leur activité antifongique contre *B.cinerea* sur différents cultivars de Pomme (**LOPEZ-REYS et al., 2010**).

Selon **FRENG et ZHENG. (2007)**, l'application de l'huile essentielle de cassia sur les tomates a réduit les pourritures grises de 40-50%.

Les substances volatiles contenus dans les H.E ont maintenu la qualité des tranches de kiwis et tomates et ont augmenté leurs durées de conservation (**WANG et BUTA, 1994 ; TZORTZAKIS et ECONOMAKIS, 2007**).

Pendant les études *in vitro*, les mandarines « *Satsuma* » inoculés avec *Geotrichum citriauratii* et traitées avec l'huile essentielle de thym a révélé moins de pourriture grise que le fruit non traité avec l'H.E (**LIU et al., 2009**).

Des études de l'équipe du laboratoire de recherche en science appliquées à l'alimentation (RESLA), ont montré que l'incorporation des huiles essentielles ou l'application par vaporisation en surface des aliments, contribue à les préserver (**CAILLET et LACROIX, 2007**).

Il est intéressant de noter que l'application de ces HEs par évaporation n'influence pas sur les propriétés sensorielles de la nourriture (**ANTHONY et al., 2003 ; ARREBOLA et al., 2010 ; LAIRD et PHILLIPS, 2011**). Ce qui explique sans doute notre choix pour la méthode de contact indirect.

La méthode d'application des H.Es par vaporisation est soutenue par l'étude d'**ALVILA et al. (2012)**, selon eux la pulvérisation des H.Es sur la surface des fruits permet aux substances volatiles et hautement hydrophobes de se lier à des composants cellulaires, tandis que les moins hydrophobes se répartissent à travers les fruits.

Lorsqu'on les utilisent pour contrôler la pourriture grise post-récolte causées par *B.cinerea* sur les raisins, les huiles essentielles permettent de prolonger la durée de conservation de 4-6 jours (**TRIPALHI et al., 2008**).

L'étude de **KARABULOT et al. (2004)** a montré que l'immersion de raisins de tables fraîchement récoltés et infectés naturellement pendant 30S dans 30% d'HE à 24°C réduit la désintégration d'environ 50% après 35 jours de stockage à 1°C.

SOYLU et al. (2010) ont enregistré, après l'application de l'H.E de l'*Origanum syriacum* sur des tomates contaminée par *B. cinerea*, une efficacité élevée et une bonne protection contre la pourriture grise.

Une autre étude montre que l'utilisation des huiles essentielles dans des emballages actifs permet la conservation des fraises fraîches, à condition que ces dernières soient conservées à 7±1°C au lieu d'une conservation à 30 ±1°C. Selon **BOUZID et LAKHLEF,**

(2013), ceci est dû au fait que la perte de poids est moins considérable lors d'une conservation à une température de réfrigération.

les huiles essentielles ont également été testées par incorporation dans des films comestibles, comme moyen potentiellement efficace de préserver la qualité des fruits et légumes frais et prolonger leur durée de conservation en contrôlant les agents pathogènes post-récolte tels que *B.cinerea* (PERETTO *et al.*, 2014). ALVILA-SASA *et al.* (2012) avaient fait l'expérience en intégrant l'origan mexicain dans les films comestibles. Cette huile a montré une grande efficacité contre *A.niger* et *Penicillium digitatum*. L'utilisation de ces huiles obtenues à partir de différentes plantes permet de supprimer la croissance fongique dans les produits frais (WILSON *et al.*, 1997 ; MEEPAGALA *et al.*, 2002 ; IMELOUANE *et al.*, 2009). Tout en étant sûr pour l'environnement que les fongicides synthétiques.

Enfin, il est à noter que selon BURT (2004) les concentrations des composés actifs dans les H.Es et leurs structures chimiques est responsable de l'activité antimicrobienne dans les fruits.

ADAM K., SIVROPOULOU A., KOKKINI S., LANARAS T., ARSENAKIS M. (1998). Antifungal activity of *Origanum vulgare* subsp. hirtum, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia* and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* .46 : 1739-1784.

ADEHOSSI E. (2013). Résistance aux antibiotiques : un problème mondial. Société de Pathologie Infectieuses de Langue Française. 5-13.

AFNOR (1996). Huiles essentielles. Volume 1 : échantillonnage et méthodes d'analyses. AFNOR, Paris. 440.

AHMET C., SABAN K., HAMDULLAH K., ERCAN K. (2005). Antifungal properties of essential oil and crude extracts of *Hypericum linarioides* Bosse. *Journal biochemical systematics and ecology*. 33 : 245-254.

ALEKHUN M.N., LEVRY S.B. (2007). Molecular mechanisms of antibacterial multigrug resistance. *Cell*.128 : 1037-1050.

ARRAS G., USAI M. (2001). Fungitoxic activity of twelve essential oils against four postharvest Citrus pathogens : chemical analysis of *Thymus capitatus* (L.) Hofmngg oil and its effect in subatmospheric pressure conditions. *Journal of Food Protection*. 64 : 1025–1029.

AVILA-SOSA R., PALOU E., JIMENEZ MUNGUIA M.T., NEVAREZ MOORILLON G.V., NAVARRO CRUZ A.R., LOPEZ-MALO A. (2012). Antifungal activity by vapor contact of essential oils added to *amaranth*, *chitosan*, or starch edible films. *International Journal of Food Microbiology*. 153(1–2) : 66–72.

BAJPAI V., SHUKLA S., KANG S. (2008). Chemical composition and antifungal activity of essential oil and various extract of *Silene armeria* L. *Bioresource Technolgy*. 99 : 8903-8908.

BARBER M. (1947). "Coagulase-positive Staphylococci resistant to penicillin." *The Journal of Pathology*. 59: 373-384.

BARRATA M.T., DORMAN H.J.D., DEANS S.G., BIONDI D.M., RUBERRO G. (1998). Chemical composition, antibacterial and antioxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils. *Journal of essential oil research*. 10: 618-625.

BASER K.H.C., BUCHBAUER G. (2010). Handbook of essential oils: Science, Technology, and Application. Ed. *Taylor and Francis Group*, LLC. United States of America. 994.

BAUDRY C., BREZELLE H. (2006). Microbiologie, immunologie, Groupe Liaisons 126 pages.

BEDI G., TONZIBO Z.F., BOTI B., CHOPARD C., MAHY J.P., N'GUESSAN Y.T. (2003). Anti-inflammatory and analgesic activities: chemical constituents of essential oils of *ocimum gratissimum*, *eucalyptus citriodora* and *cymbopogon giganteus* inhibited lipoygenase l-1 and cyclooxygenase of pghs. *Bulletin of the chemical society of Ethiopia*. 17: 191-197

BEDI G., TONZIBO Z.F., CHOPARD C., N'GUESSAN Y.T. (2004). Etude des effets antidouleur des huiles essentielles de *chromolaena odorata* et de *Mikania cordata*, par action sur la lipoygenase L-1 de soja. *Physical Chemical News*. 15 : 124-127.

BEDI G., TONZIBO Z.F., OUSSOU K.R., CHOPARD C., MAHY J.P., N'GUESSAN Y.T. (2010). Effect of essential oil of *chromolaena odorata* (Asteracea) from Ivory Coast, on cyclooxygenase function of prostaglandine-H synthase activity. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 4(8) : 535-538.

BELAICH P. (1979). Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. L'aromatogramme tome I, Edition Maloine.

BEN ARFA A., COMBES S., PREZIOSI-BELLOY L., GONTARD N., CHALIER P. (2006). Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure, *letters in applied Microbiology*. 43: 149-154.

BENDAHO M., MUSELLI A., GRIGNON-DUBOIS M., BENYUCEF M., DESJOBERT J.M., BERNARDINI A.F., COSTA J. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation. *Food Chemistry*. 106(1): 132-136.

BENJILALI B. (2004). Extraction des plantes aromatiques et médicinales cas particulier de l'entraînement à la vapeur d'eau et ses équipements. Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation- *Manuel pratique*. 18-28.

BERNARD T., PERIAU F., BRAV O., DELMAS M., GASET A. (1988). Extraction des huiles essentielles. Chimie et Technologie. *Information chimie*. 179-182.

BINET P., BRUNEL J-P. (1968). Physiologie Végétale. Tome II. Edit., Doin, Deren. Paris.

BONNAFOUS CH. (2013). Traité scientifique : Aromathérapie, aromatologie et aromachologie.

BONTEN M.J., AUSTIN D.J., LIPSITCH M. (2001). Understanding the spread of antibiotic resistant pathogens in hospitals: mathematical models as tools for control. *Clinical Infection Diseases*. 33(10) : 1739-1745.

BOUCHRA C., ACHOURI M., IDRISSE-HASSANI L.M., HMAMOUCHE M. (2003). Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers : Fr. *Journal of Ethnopharmacology*. 89: 165-169.

BOUHDID S., SKALI S. N., IDAOMAR M., ZHIRI A., BAUDOUX D., AMENSOUR M., ABRINI J. (2008). Antibacterial and antioxidant activities of *Origanum compactum* essential oil African *Journal of Biotechnology*. 7 (10) :1563-1570

BOUHDID S., SKALI S.N., IDAOMAR M., ZHIRI A., BAUDOUX D., AMENSOUR M., ABRINI J. (2008). Antibacterial and antioxidant activities of *Origanum compactum* essential oil. *African journal of biotechnology*. 7: 1563–1570.

BOUMAZA D. (2011). Séparation et caractérisation chimique de quelques biomolécules actives de deux plantes médicinales : *Inula viscosa*, *Rosmarinus officinalis* de la région d’Oran. Mémoire de magister en chimie organique. Université d’Oran. 32-33.

BOURKHISS B., OUHSSIN M., BOURKHISS M., SATRANI B., FARAH A. (2007). Composition chimique et bioactivité de l’huile essentielle des rameaux de *Tetraclinis articulata*. *Bulletin de la société de pharmacie de Bordeaux*. 146 : 75-84.

BOUYAHYA J., ABRINI Y., BAKRI N., DAKKA. (2017). Screening phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits d'*Origanum compactum*. *Journal Phytothérapie*.

BREIDENSTEIN E.B., DE LA FUENTE-NUNEZ C., HANCOCK R.E. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol.* 19: 419-426.

BRIAND Y.M. (2012). Aspects de la résistance Bactérienne Aux Antibiotiques. Edition L'Harmattan., Paris. 11-37.

BRUNETON J. (1993). Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. *Lavoisier technique et documentation*, Paris. 915-916.

BRUNETON J. (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plante médicinales, 3^{ème} édition Tec. & Doc, Paris (France). 1120-1125.

BURT S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. *International Journal of Food Microbiology.* 94 : 223-250.

BUSH K. (1997). The evolution of β -lactamases. in Antibiotic resistance: origins, evolution, selection, and spread, John Wiley and son, chichester. 207: 152–166.

BUSH K. (2004). "Antibacterial drug discovery in the 21st century." *Clinical Microbiology and Infection.* 10: 10-17.

BUSH K. (2004). "Why it is important to continue antibacterial drug discovery." *ASM News.* 70: 282–287.

CAILLET S., YU H., LESSARD S., LAMOUREUX G., AJDUKOVIC D., LACROIX M. (2007). Fenton reaction applied for screening natural antioxidants. *Food Chemistry.* 100 : 542–552.

CAMELE I., ALTIERI L., DE MARTINO L., DE FEO V., MANCINI E., RANA G.L. (2012). In vitro control of post-harvest fruit rot fungi by some plant essential oil components. *International Journal of Molecular Sciences*. 13: 2290–2300.

CARLE S. (2009). La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important. *Pharmactuel*. 42 Supplement. 2 : 6-21.

CAVALEIRO C., PINTO E., GONÇALVES M.J., SALGUEIRO L. (2006). Antifungal activity of Juniperus essential oils against dermatophyte, Aspergillus and Candida strains. *Journal of Applied Microbiology*. 100 :1333-1341.

CHAMI F., CHAMI N., TENNIS S., TROUILLAS J., REMMAL A. (2004). Evaluation of carvacrol and eugenol as prophylaxis and treatment of vaginal candidiasis in an immunosuppressed rat model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 54: 909-914.

CHANDRA J., KUHN. D. M., MUKHERJEE P .K ., HOYER L. L., MCCORMICK T., GHANNOUM M. A. (2001). Biofilm formation by the fungal pathogen *candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *Journal of bacteriology*. 183(18) : 5385-5394.

CHARAI M., MOSADDAK M., FAID M. (2011). Chemical composition and antimicrobial activities of two Aromatic Plants: *Origanum majorana* L, and *Origanum compactum* Benth. *Journal of essential oil research*. 657-664.

COMMISSION EUROPEENNE (2011). Plan d'action pour combattre les menaces croissantes de la résistance aux antimicrobiens. Communication de la Commission au Parlement Européen et au Conseil.

CONSENTINO S., TUBEROSA C.I.G., PISANO B., SATTA M., MASCIA V., ARZEDI E., PALMAS F. (1999). Activité antimicrobienne in vitro et composition chimique des huiles essentielles de Thymus de Sardaigne. *Letters in Applied Microbiology*. 29: 130–135.

COUDERCHET M. (2003). Benefits and problems of fungicide control of *Botrytis cinerea* in vineyards of Champagne. *Vitis*. 42: 165-169.

COURVALIN P., DENIS M.C., PLOY M.P.D., GARILHE P., TRIEU-CULOT F., UNIVERSALIS. (2001). "Antibiotiques." Encyclopaedia Universalis.

COX G., WRIGHT G.D. (2013). Mimi Review Intrinsic antibiotic resistance : Mechanisms, origins, challenges and solutions. *International journal of Medical Microbiology*. 303 : 287-292.

COX S.D., MANN C.M., MARKHAM J.L., BELL H.C., GUSTAFSON, J.E., WARMINGTON, J.R., WYLLIE S.G. (2000). The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*. 88: 170-175.

CUENCA-ESTRELLA M. (2014). Antifungal drug resistance mechanisms in pathogenic fungi : from bench to bedside. *Clinical Microbiology Infection*. 20 (Suppl 6) : 9-54.

CUTLER H.G., HILL R.A., WARD B.G., ROHITHA B.H., STEWART A. (1996). Antimicrobial, insecticidal and medicinal properties of natural products. Biotechnologies for Improved Foods and Flavours. *American Chemical Society*. 51–66.

DAFERERA D.J., ZIOGAS B.N., POLISSIOU M.G. (2003). The effectiveness of plant essential oils in the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium sp.* And *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop Protection*. 22 : 39–44.

DAKIR M., EL HANBALI F., MELLOUKI F., AKSSIRA M., BENHARREF A., QUILEZ DEL MORAL J.F., BARRERO A.F. (2005). Antibacterial diterpenoids from *Cedrus atlantica*. *Natural product research*, 19: 719-722.

DANNAOUI E., DESNOS-OLLIVIER M., GARCIA-HERMOSO D., GRENOUILLET F., CASSAING S., BAIXENCH M.T., BRETAGNE S., DROMER F., LORTHOLARY O. (2012). *Candida* spp. with acquired echinocandin resistance, France, 2004-2010. *Emerging Infectious Diseases*. 18 : 86-90.

DERWICH E., BENZIANE Z., BOUKIR A. (2010). Chemical composition and In vitro antibacterial activity of the essential oil of *Cedrus atlantica*. *International journal of agriculture and biology*. 12: 381-385

DIK A.J., WUBBEN J.P. (2004). Epidemiology of *Botrytis cinerea* diseases in greenhouses: 319-331. In: *Botrytis: biology, pathology and control*. ELAD Y., WILLIAMSON B., TUDZYNSKI and DEKEN N. eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.

DOBRE A. A., GAGIU V., NICULITA P. (2011). Preliminary studies on the antimicrobial activity of essential oils against food borne bacteria and toxigenic fungi. *Food Technology*. 35(2) : 16–26.

DORMAN H.J.D., DEANS S.G. (2000). Antimicrobial agents from plants : antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. 88 : 308–316.

DOUGLAS L.J. (2002). Medical importance of biofilms in *Candida* infections. *Revista Iberoamericana de Micología*. 19: 139-143.

EBERHARD T., ROBERT A., ANNELESE L. (2005). Plantes aromatiques, épice aromates, condiments et huiles essentielles. *Lavoisier technique et documentation*. Paris, France.

EL HAIB A. (2011). Valorisation de terpènes naturels issus de plantes marocaines par transformations catalytiques. Thèse en chimie organique et catalyse. Université de Toulouse, France. 9-13.

FERNANDEZ L., HANCOCK R.E. (2012). Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. 25: 661-681.

FINKERS R., BAI Y.L., VAN DEN BERG P., VAN BERLOO R., MEIJER-DEKENS F., TEN HAVE A., VAN KAN J., LINDHOUT P., VAN HEUSDEN A.W. (2008). Quantitative resistance to *Botrytis cinerea* from *Solanum neorickii*. *Euphytica*. 159: 83-92.

FRANCHOMME P., PENOËL D. (2001). L'aromathérapie exactement : Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des extraits aromatiques. Fondements, démonstrations, illustration, et applications d'une science médicale naturelle. Editeur ROGER JOLLOIS.

GACHANGO E., KIRK W., SCHAFER R., WHARTON P. (2012). Evaluation and comparison of biocontrol and conventional fungicides for control of postharvest potato tuber diseases. *Biological Control*. 63:15-120.

GATTO M.A., IPPOLITO A., LINSALATA V., CASCARANO N.A., NIGRO F., VANADIA S., DI VENERE D. (2011). Activity of extracts from wild edible herbs against postharvest fungal diseases of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology* 61: 72-82.

GAUDEL P. (2013). Juste usage des antibiotiques à l'hôpital de Brabois Adultes CHU de Nancy : Bilan du rôle du pharmacien et de l'équipe opérationnelle en infectiologie de 2006 à 2012. (Thèse pour l'obtention du diplôme d'état de Docteur en Pharmacie). Université de Lorraine. France.

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* (Endl.) Manettiex Carrière seeds essential oil. *Mediterranean Journal of Chemistry*. 3(5): 1027-1036.

GOOSSENS H., GUILLEMOT D., FERECHE M., SCHLEMMER B., COSTERS M., VAN BREDA M., BAKER L.J., CARS O., DAVEY P.G. (2006). National campaigns to improve antibiotic use. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 62 : 373-379.

GUARDABASSI L., COURVALIN P. (2006). Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance. In : Aarestrup F.M (Ed), Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. *ASM Press : Washington*. 1-18.

GUETSKY R., SHTIENBERG D., ELAD Y., DINOOR A. (2001). Combining biocontrol agents to reduce variability of biological control. *Phytopathology*. 91: 261-267.

GUINEA J. (2014). Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. *Clinical Microbiology Infection*. 20 (Suppl 6) : 5-10.

HAMMER K.A., CARSON C.F., RILEY T.V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*. 86 : 985–990.

HAMMER K.A., CARSON C.F., RILEY T.V. (2006). *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clinical microbiology reviews*. 19 (1): 50-62.

HARRY J.B., SONG J.L., LYONS C.N., WHITE T.C. (2002). Transcription initiation of genes associated with azole resistance in *candida albicans*. *Medical Mycology*. 40: 73-81.

INOUE S., YAMAGUCHI H., TAKIZAWA T. (2001). Screening of the antibacterial effects of variety of essential oils on respiratory tract pathogens, using a modified dilution assay method. *Journal of infection and chemotherapy*. 7: 251-254.

ISO (1997). Norme ISO 9235 : Matières premières d'origine naturelle – Vocabulaire : 2.

JABRA-RIZK M.A., FALKLER W.A., MEILLER T.F. (2004). Fungal Biofilms and Drug Resistance, *Emerging Infectious Diseases*. 10(1): 14-19.

JOUAULT S. (2012). La qualité des huiles essentielles et son influence sur leur efficacité et sur leur toxicité.

KARABULUT O.A., MLIKOTA-GABLER F., MANSOUR M., SMILANICK J.L. (2004). Postharvest ethanol and hotwater treatments of table grapes to control gray mold. *Postharvest Biology and Technology*. 34 : 169–177.

KARMEN V., BOJANA B., MARGARETA V., FRANC P. (2003). Effect of the antifungal activity of oxygenated aromatic essential oil compounds on the white-rot *Trametes versicolor* and the brown-rot *Coniophora puteana*, *international biodeterioration and biodegradation*. 51-59.

KHOSRAVI A.R., SHOKRI H., KERMANI S., DAKHILI M., MADANI M., PARSA S. (2011). Antifungal properties of *Artemisia sieberi* and *Origanum vulgare* essential oils against *Candida glabrata* isolates obtained from patients with vulvovaginal candidiasis. *Journal de Mycologie Médicale*. 21 : 93-102.

KIM E.Y., BAIK I.H., KIM J.H., KIM S.R., RHYU M.R. (2004). Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. *Kor. Journal of Food Science and Technology*. 36 : 333–338.

KNOWLES J.R., ROLLER S., MURRAY D.B., NAIDU A.S. (2005). Antimicrobial Action of Carvacrol at Different Stages of Dual-Species Biofilm Development by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Applied Environmental Microbiology*. 71(12): 797-801.

KOCH C., REICHLING J., SCHNEELE J., SCHNITZLER P. (2008). Inhibitory effect of essential oils against herpes simplex virus type 2. *Phytomedicine*. 15 (1-2) : 71-78.

KOUL O., WALIA S., DHALIWAL G.S. (2008). Essential oils as green pesticides : potential and constraints. *Biopestic*. 4 : 63-84.

KUMAR A., SCHWEIZER H.P. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Adv. Drug Delivery Reviews*. 57: 1486-1513.

LAHLOU M. (2004). Methods to study 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. Institut de la nutrition, de l'alimentation et des technologies Agro-alimentaire. Université Mentouri de Constantine, Algérie.

LAIRD K., PHILLIPS C. (2012). Vapour phase : A potential future use for essential oils as antimicrobials. *Letters in Applied Microbiology*. 54(3) : 169–174.

LAMARTI A., BADO C., CARDE J.P. (1993). Etude chromatographique de l'huile essentielle de la plantule de fenouil amer (*Foeniculum vulgare Mill*) ; caractéristique spectrales (UV, IR, SM) de ses constituants. *Bulletin de la société de pharmacie de Bordeaux*. 132 : 73-89.

LAMBERT R.J.W., SKANDAMIS P.N., COOTE P.J., NYCHAS G.J.E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Applied Microbiology*. 91: 453-462.

LATORRE B.A., SPADARO I., RIOJA M.E. (2002). Occurrence of resistant strains of *Botrytis cinerea* to anilinopyrimidine fungicides in table grapes in Chile. *Crop Protection*. 21: 957-960.

LAVIGNE J. F., SOTTO A., MERLE C., JOURDAN J., SOUSSY C. J., SIROT D. (2009). Résistance enzymatique d'*Escherichia coli* aux bêta-lactamases et prévalence en clinique, pathologie Biologie. 50(6) : 388-393.

LEROUX P. (2004). Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides. Pp 195-222, In: *Botrytis: biology, pathology and control*. ELAD Y., WILLIAMSON B., TUDZYNSKI and DEKEN N., eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.

LEROUX P., CHAPELAND F., DESBROSSES D., GRETT M. (1999). Patterns of cross-resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) isolates from french vineyards. *Crop Protection*. 18: 687-697.

LIU X., WANG L.P., LI Y.C., LI H.Y., YU T., ZHENG X.D. (2009). Antifungal activity of thyme oil against *Geotrichum citri-aurantii* in vitro and in vivo. *Journal of Applied Microbiology*.107 :1450-1456.

LOPEZ-REYES J.G., SPADARO D., GULLINO A.M.L., GARIBALDIA A. (2010). Efficacy of plant essential oils on postharvest control of rot caused by fungi on four cultivars of apples in vivo. *Flavour Fragrance Journal* .25:171-177.

MADARAS-KELLY K. (2003). Optimizing antibiotic use in hospitals: the role of population based antibiotic surveillance in limiting antibiotic resistance. Insights from the society of infectious diseases pharmacists. *Pharmacotherapy*.23: 33-1627.

MARI M., BRIGATI S., BERTOLINI P. (2007). Fungicidal activity of plant volatile compounds for controlling *Monilinia laxa* in stone fruit. *Plant Disease*. 91: 30–35.

MARRIOTT P.J., SHELLIE R., CORNWELL C. (2001). Review: gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. *Journal of chromatography A*, 936: 1-21.

MARTINEZ J.L., BAQUERO F. (2000). Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 44(7) : 1771-1777.

MARTINEZ-ROMERO D., SERRANO M., BAIEN G., GUILLEN F., ZAPATA P.J., VALVERDE J.M., CASTILLO S., FUETES M., VALERO D. (2008). The use of a natural fungicide as an alternative to preharvest synthetic fungicide treatments to control lettuce deterioration during postharvest storage. *Postharvest Biology and Technology* .47: 54-60.

MATEUS C., CROW S.A., J R., AHEARN D.G. (2004). Adherence of *Candida albicans* to silicone induces immediate enhanced tolerance to Fluconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 48(9) : 3358-3366.

MEDEIROS A.A. (1997). "Evolution and dissemination of β -lactamases accelerated by generations of β -lactam antibiotics." *Clinical Infectious Diseases*. 24 :19-45.

MIBARKI N. (2010). Extraction de l'huile essentielle de *Thymus fantansii* et application à la formulation d'une forme médicamenteuse-antimicrobienne. Thèse de magistère en génie des procédés chimiques et pharmaceutiques. Université de M'hamed BOUGARA, Boumerdes.

MIMA T., KOHIRA N., LI Y., SEKIYA H., OGAWA W., KURODA T., TSUCHIYA T. (2009). Gene cloning and characteristics of the RND-type multidrug efflux pump MuxABC-OpmB possessing two RND components in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*. 155: 3509-3517.

MINISTERE DU TRAVAIL, DE L'EMPLOI ET DE LA SANTE. (2011). Plan national d'alerte sur les antibiotiques 2011-2016.

MONNET D.L., MACKENZIE F.M., LOPEZ-LOZANO J.M., BEYAERT A., CAMACHO M., WILSON R., STUART D., GOULD I.M. (2004). Antimicrobial drug use and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Aberdeen, 1996-2000. *Emerging Infectious Disease journal*. 10: 43-1432.

MULLER A., THOUVEREZ M., TALON D., BERTRAND X. (2003). Contribution de la pression de sélection antibiotique dans l'acquisition de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) dans un centre hospitalier universitaire. *Pathologie Biologie*. 51: 9-454.

MULLER-RIEBAU F., BERGER B., YEGEN, O. (1995). Chemical Composition and Fungitoxic Properties to Phytopathogenic Fungi of Essential Oils of Selected Aromatic Plants Growing Wild in Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 43 : 2262-2266.

NARDONI S., MUGNAINI L., PAPINI R., FIASCHI M., MANCIANTI F. (2013). Canine and feline dermatophytosis due to *Microsporum gypseum*: a retrospective study of clinical data and therapy outcome with griseo fulvin. *Journal de Mycologie Médicale*. 23: 7-164.

NAZER AI., KOBILINSKY A., THOLOZAN JL., DUBOIS-BRISSENET F. (2005). Combinations of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella* sv. Typhimurium: a synergistic effect. *Food Microbiology*. 22: 391-398.

NETT J.E., GUTE K.M., RINGEISEN A., HOLOYDA K.A., ANDES D.R. (2008). Reduced Biocide Suscetibility in *Candida albicans* Biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 52(2) : 3411-3413.

NGUEFACK J., LETH V., AMVAM ZOLLO P.H., MATHUR S.B. (2004). Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. *International Journal of Food Microbiology*. 94: 329-363.

NIKAIDO H. (2009). Multigrug resistance in bacteria. *Annual Review of Biochemistry*. 78 : 119-146.

NOBLE W.C., VIRANI Z., CREE R.G. (1992). Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters*. 72 : 195-198.

NORDLUND D.A. (1996). Biological control, integrated pest management and conceptual models. *Biocontrol News and Information*. 17 : 35-44.

OLIVARES J., BERNARDINI A., GARCIA-LEON G., CORONA F., SANCHEZ M.B., MARTINEZ J.L. (2013). The intrinsic resistome of bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology*. 4: 1-15.

ORMANCEY X., SISALLI S., COUTIERE P. (2001). Formulation of essential oils in functional perfumery. *Parfums, Cosmetiques, Actualites*. 157: 30-40.

PADRINI F., LUCHERONI M.T. (2006). Le grand livre des huiles essentielles. Édition De Vecchi S.A. Paris : 11-18.

PELLERIN P. (1991). Supercritical fluid extraction of natural raw materials for the flavour and perfume industry. *Perfumer Flavorist*, 16 (4) : 37-39.

PERLIN D.S. (2014). Echinocandin resistance, susceptibility testing and prophylaxis: implications for patient management *Drugs*. 74: 85-1573.

PERON L., RICHARD H. (1992). Epices et aromates, techniques et documentations. Lavoisier.

PINTO E., VAZ C.P., SALGUEIRO L. (2006). Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *J Med Microbiol.* 55: 1367-1440.

POOLE K. (2003). Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology and Infection.* 10: 12-26.

POZZATTI P., LORETO É.S., NUNES MARIO D.A., ROSSATO L., SANTURIO J.M., ALVES S.H. (2010). Activities of essential oils in the inhibition of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* germ tube formation. *Journal de Mycologie Médicale.* 20: 185-194.

PRESCOTT H., KLEIN WILEY J.M., SHERWOOD L.M., WOOLVERTON C.J. (2010). *Microbiologie. De boeck., Bruxelles.* 849-859.

PRONOVOST M. (2014). Site de Michel Pronovost. Cours de biologie NP1. Cellules. Vol. 2014. Michel Pronovost, Collège Jean-de-Brébeuf.

PURCHON N. (2001). La bible de l'aromathérapie. Edition Marabout. Allemagne. *In* **MAYER F. (2012).** Utilisations thérapeutiques des huiles essentielles : Etude de cas en maison de retraite. Faculté de pharmacie. Université de LORRAINE, France.

RAKOTONIRINA E.F., RAJAONARISON J.F., RAOELISON E.G., RAJAONARIVELO J.P., MANGA N., SOLOFONIAINA M., BENJA R., RANDRIAMAMPIONONA D., RABEMANANTSOA C., CHEUK K., URVERG RATSIMAMANGA S., LECLERCQ J.Q. (2010). Antimicrobial activity of 23 endemic plants in Madagascar. *Tropical journal of pharmaceutical research.* 9(2): 165-171.

RAMAGE G., BACHMANN S., PATTERSON T.F., WIKES B.L., LOPEZ.RIBOT J.L. (2002). Investigation of multidrug efflux pumps in relation to Fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 49: 973-980.

RAZZAGHI-ABYANEH M., SHAMS-GHAHFAROKHI M., YOSHINARIT., REZAEI M.B., JAIMAND K., NAGASAWA H., SAKUDA S. (2008). Inhibitory effects of *Satureja hortensis* essential oil on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *International Journal of Food Microbiology*. 123 : 228–233.

REGNIER T., COMBRINCK S., DU PLOOY W., BOTHA B. (2010). Evaluation of *Lippia scaberrima* essential oil and some pure terpenoid constituents as postharvest mycobiocides for avocado fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 57 : 176-182.

RENATA P.S., EDSON P.N., RONALDO F.N., GILVANDETE M.P.S., EDILBERTO S.R., OTILIA D.L. (2006). Chemical composition and larvicidal activity of the essential oils of *Cordia leucomalloides* and *Cordia curassavica* from the Northeast of Brazil. *Journal of the brazilian chemical society*. 17(5) : 1027-1030.

RODRIGUEZ-MARTINEZ J.M., VELASCO C., BRIALES A., GARCIA I., CONEJO M.C., PASCUAL A. (2008). Qnr-like pentapeptide repeat proteins in gram-positive bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 61 : 1240-1243.

SALLE J-L. (2004). Les huiles essentielles synthèse d'aromathérapie. Edition Frison-Roche. 26-37.

SARI M., BIONDI D.M., KAABECHE M., MANDALARI G., D'ARRIGO M., BISIGNANO G., RUBERTO G. (2006). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of several populations of Algerian *Origanum glandulosum* Desf. *Flavour and Fragrance Journal*. 21(6) : 890-898.

SAWAMURA M. (2000). Aroma and functional properties of japaneseyuzu (*Citrus junos* Tanaka) essential oil. *Arom Resources*. 1 (1): 14-19.

SBAYOU H., OUBRIM N., BOUCHRIF B., ABABOU B., BOUKACHABINE K., AMGHAR S. (2014). Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Origanum compactum* against foodborne bacteria. *International Journal of Engineering Research and Technology* 3: 3562-3569.

SERGEEVA V., NAIR N.G., VERDANEGA J.R., SHEN C., BARCHIA I., SPOONER-HART R. (2002). First report of anilinopyrimidine-resistant phenotypes in *Botrytis cinerea* on grapevines in Australia. *Australasian Plant Pathology*. 31: 299-300.

SERRANO M., MARTINEZ-ROMERO D., CASTILLO S., GUILLUEN F., VALERO D. (2005). The use of antifungal compounds improves the beneficial effect of map in sweet cherry storage. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 6 : 115-123.

SHAN B., CAI Y.Z., BROOKS JD., CORKE H. (2007). The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology*. 117(1): 112-119.

SHIRNER M. (2004). Huile essentielles. Description et utilisation de plus de 200 huiles essentielles et huiles végétales. *Guy Trédaniel Editeur*.

SIANI A.C., RAMOS M.F.S., MENEZES-DE-LIMA J.R., RIBEIRO-DOS-SANTOS R., FERNADEZ-FERREIRA E., SOARES R.O.A., ROSAS E.C., SUSUNAGA G.S., GUIMARAES A.C., ZOGHBI M.G.B., HENRIQUES M.G.M.O. (1999). Evaluation of anti-inflammatory related activity of essential oils from the leaves and resin of species of protium. *Journal of ethnopharmacology*. 66 (1) : 57-69.

SÖKMEN M., SERKEDJIEVA J., DAFERERA D., GULLUCE M., POLISSIOUM., TEPE B., AKPULAT A., SAHIN F., SÖKMEN A. (2004). In vitro antioxidant, antimicrobial, and antiviral activities of the essential oil and various extracts from herbal parts and callus cultures of *Origanum acutidens*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52 : 3309-3311.

SOYLU E. M., KURT Ş., SOYLU S. (2010). In vitro and in vivo antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. *International Journal of Food Microbiology*. 143(3) :183–189.

SOYLU E. M., SOYLU S., KURT S. (2006). Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. *Mycopathologia*.161 : 119-128.

TAUBES G. (2008). The bacteria fight back. *Science*. 321: 61-85.

THOMPSON D.P. (1996). Inhibition of growth of *mycotoxigenic Fusarium* species by butylated hydroxyanisole and/or carvacrol. *Journal of Food Protection*. 59 : 412–415.

TZORTZAKIS N.G. (2007a). Maintaining postharvest quality of fresh produce with volatile compounds. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 8 : 111-116.

TZORTZAKIS N.G. (2007b). Methyl jasmonate-induced suppression of anthracnose rot in tomato fruit. *Crop Protection*. 26 :1507-1513.

TZORTZAKIS N.G., ECONOMAKIS C.D. (2007). Maintaining postharvest quality of tomato fruit employing methyl jasmonate and ethanol vapour treatment. *Journal of Food Quality*. 30 : 567–580.

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*. 1561-1568.

VALERO M., FRANCES E. (2006). Synergistic bactericidal effect of carvacrol, cinnamaldehyde or thymol and refrigeration to inhibit *Bacillus cereus* in carrot broth. *Food Microbiology*. 23 : 68-73.

VALNET M. (2005). Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth International. *Journal of Food Microbiology*, 85: 73-81.

VELDHUIZEN E.J.A., TJEERDSMA-VAN, BOKHOVEN J.L.M., ZWEIJTZER C., BURT S.A., HAAGSMAN H.P. (2006). Structural requirements for the antimicrobial activity of carvacrol, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54: 1874-1879.

VOKOU D., KOKKINI S., BRESSIERE J.M. (1988). *Origanum onites* (Lamiaceae) in Greece Distribution, volatile oil yield, and composition. *Economy botanic*. 42 : 407-412.

WANG C.Y., BUTA J.G. (1994). Methyl jasmonate reduces chilling injury in *Cucurbita pepo* through its regulation of abscisic acid and polyamine levels. *Environmental and Experimental Botany*. 34 : 427–432.

WAX R.G., LEWIS K., SALYERS A., TABER H. (2008). *Bacterial resistance to antimicrobials*, 2nd edition. CRC press, Floride, USA.

WILLEM J.P. (2002). Le guide des huiles essentielles pour vaincre vos problèmes de santé. Edition LMV. In **MAYER F. (2012).** Utilisations thérapeutiques des huiles essentielles : Etude de cas en maison de retraite. Faculté de pharmacie. Université de LORRAINE, France.

WILLEM J.P. (2002). Le guide des huiles essentielles pour vaincre vos problèmes de santé. Edition LMV.

WINGARD J. R., LEATHER H. (2004). A new era of antifungal therapy. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 10 : 73-90.

YAN-QIU C., XIN-HONG C., YI Z., QUN Z., PENG N. (2008). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Volatile Oil of Six Gymnosperm Species Leaves from Shanghai. *Bioinformatics and Biomedical Engineering*. 4574-4577.

ZAMBONELLI A., DAULERIO A.Z., SEVERI A., BENVENUTI S., MAGGI L., BIANCHI A. (2004). Chemical composition and fungicidal activity of commercial essential oils of *Thymus vulgaris* L. *Journal of Essential Oil Research*. 16(1) : 69-74.

ZENG W.C., HE Q., SUN Q., ZHONG K., GAO H. (2012a). Antibacterial activity of water-soluble extract from pine needles of *Cedrus deodara*. *International journal of food microbiology*, 153: 79-81.

ZENG W.C., ZHANG Z., GAO H., JIA L.R., HE Q. (2012b). Chemical composition, antioxidant, and antimicrobial activities of essential oil from pine needle (*Cedrus deodara*). *Journal of Food Science*. 77: C824–826.

ZIMMERMANN E. (2012). Lavender essential oil for management of generalized anxiety disorders: evidence and practical experience. *The International Journal of Clinical Aromatherapy*.

ZRIRA S., GHANMI M. (2016). Chemical composition and antibacterial activity of the essential of *Cedrus atlantica*. (Cedarwood oil). *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 19: 1267-1272.

ANNEXE I : Composition des principaux milieux de cultures utilisés

- **Eau physiologique stérile**

Composition en g /l

Chlorure de sodium (NaCl)9g

Eau distillée1000ml

pH = 7

Stérilisation à 120°C /15mn

- **Gélose Muller Hinton Agar (MHA)**

Composition en g/l

Extrait de viande3g

Hydrolat acide de caséine17,5 g

Agar18g

pH= 7,4

Stérilisation à 120°C/15mn

- **Bouillon Brain Heart Infusion (BHIB)**

Composition en en g /l

Protéase-peptone.....10g

Infusion de cervelle de veau.....12,5g

Chlorure de sodium.....2,5g

Eau distillée.....1000ml

Ph=7,4

Stérilisation à 120°C/15mn

- **Milieu Sabouraud**

Eau distillée1000ml

Peptone10g

Glucose.....20g

Agar-agar15g

Annexe II : Résultats des tests statistiques

Tableau 1 : Table de l'ANOVA pour l'analyse de la variance de la sensibilité des bactéries vis-à-vis de l'huile essentielle *Cedrus atlantica*.

Tests Univariés de Significativité pour bactéries (Feuille de données2) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse							
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p		
ord. origine	867,0000	1	867,0000	2821,424	0,000000		
classes	13,6667	3	4,5556	14,825	0,001246		
Erreur	2,4583	8	0,3073				

Tableau 2 : Table de Newman Keuls pour l'analyse de la variance de la sensibilité des bactéries vis-à-vis de l'huile essentielle *Cedrus atlantica*.

Test de Newman-Keuls ; variable bactéries (Feuille de données2) Groupes Homogènes, alpha = ,05000 Erreur : MC Inter = ,30729, dl = 8,0000						
Cellule N°	classes	bactéries Moyenne	1	2		
2	Staphylococcus aureus	7,6667	****			
3	Klebsiella pneumoniae	8,0000	****			
4	Pseudomonas aeruginosa	8,0000	****			
1	Acinetobacter baumannii	10,3333		****		

Tableau 3 : Table de Newman Keuls pour l'analyse de la variance de la sensibilité des bactéries vis-à-vis de l'huile essentielle *Cedrus atlantica*.

Test de Newman-Keuls ; variable bactéries (Feuille de données2) Probabilités Approximatives des Tests Post Hoc Erreur : MC Inter = ,30729, dl = 8,0000						
Cellule N°	classes	{1} 10,333	{2} 7,6667	{3} 8,0000	{4} 8,0000	
1	Acinetobacter baumannii		0,001791	0,002348	0,001035	
2	Staphylococcus aureus	0,001791		0,482662	0,749861	
3	Klebsiella pneumoniae	0,002348	0,482662		1,000000	
4	Pseudomonas aeruginosa	0,001035	0,749861	1,000000		

Tableau 4 : Table de l'ANOVA pour l'analyse de la variance de la sensibilité des bactéries vis-à-vis de l'huile essentielle *Origanum compactum*.

Tests Univariés de Significativité pour bactéries (Feuille de données2) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse							
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p		
ord. origine	5698,521	1	5698,521	211,3825	0,000000		
classes	221,063	3	73,688	2,7334	0,113586		
Erreur	215,667	8	26,958				