

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

UNIVERSITE MOULOUD 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
SPECIALITE : BIOTECHNOLOGIE MICROBIENNE

THEME

**Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles
essentielles de *Pinus sylvestris* et *Pelargonium asperum*
en combinaison avec la nisine sur des
bactéries pathogènes**

Réalisé par :

M^{elle} AIT SALEM LYNDA

Devant le jury :

PRESIDENT:	Mr BOUAZZA B.	Maitre de conférences B à l'UMMTO
PROMOTEUR :	Mr OUELHADJ A.	Maitre de conférences A à l'UMMTO
EXAMINATRICE :	Mme BENAZZOUZ K.	Maitre assistante A à l'UMMTO
EXAMINATEUR :	Mr MOUALEK I.	Maitre assistant A à l'UMMTO

Année universitaire 2015/2016

Remerciements

Je tiens à remercier,

*Mon promoteur, Monsieur **OUELHADJ A.** Maitre de conférences A à UMMTO pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité et ses conseils.*

*Monsieur **BOUAZZA B.** Maitre de conférences B à l'UMMTO, pour avoir accepté de présider le jury.*

*Madame **BENAZZOZ K.** Maitre assistante A à l'UMMTO, pour avoir accepté d'examiner notre travail.*

*Monsieur **MOUALEK I.** Maitre assistant A à l'UMMTO, pour avoir accepté d'examiner notre travail.*

Les ingénieurs du laboratoire de microbiologie de l'UMMTO pour leurs disponibilités.

Dédicaces

Je dédie ce mémoire :

A mes parents avec toute ma reconnaissance.

A mes frères Boussad, Aghiles et juba

A mes belles sœurs Tassadit et Emilie

Et à ma merveilleuse Mélina

Liste des abréviations

ATB :	Antibiotique.
H.Es :	Huiles essentielles
ATP :	Adénosine triphosphate
pH :	Potentiel d'hydrogène
AFNOR :	Association Française de NORmalisation
UV :	Ultra-violet
V/V :	Volume par volume
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
UFC/ml :	Unité formant colonies par millilitre
DO:	Densité optique
ATCC:	American Type Culture Collection
MLS :	Macrolides, Lincosamides, Streptogramines
SARM:	<i>Staphylococcus Aureus</i> Résistants à la Methicilline
PBP :	Penicillin Binding Protein
FAO :	Organisation de l'Agriculture et de l'Alimentation
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
FDA :	Food and Drug Administration
CMI :	Concentration Minimale Inhibitrice

Liste des figures

Figure 1 : Exemples de structures de monoterpènes	6
Figure 2 : Exemples de structures de sesquiterpènes	6
Figure 3 : Exemples de structures de composés dérivés du phénylpropane	7
Figure 4 : Schéma du principe de la technique d'hydrodistillation	9
Figure 5 : Montages pour l'entraînement à la vapeur d'eau et l'hydrodiffusion	10
Figure 6 : Système d'extraction des huiles essentielles par micro-ondes	11
Figure 7 : Les mécanismes de résistance aux antibiotiques	22
Figure 8a : Structure de la paroi des bactéries Gram négatives	25
Figure 8b : Structure de la paroi des bactéries Gram positives.....	25
Figure 9 : Structure de la nisine A et de la nisine Z.....	29
Figure 10 : Modèle de formation d'un pore transmembranaire par la nisine	30
Figure 11 : Photographie de <i>Pinus sylvestris</i>	32
Figure 12 : Photographie de <i>Pelargonium asperum</i>	33
Figure 13 : Illustration de la méthode d'aromatogramme.....	38
Figure 14 : Témoins négatifs réalisés avec le DMSO sur les six bactéries testées.....	44
Figure 15 : Témoins positifs réalisés avec les antibiotiques Amoxicilline (AM, 25 µg), Gentamicine (GN, 10 µg) et Oxytétracycline (O, 30 µg) sur les six souches bactériennes testées	45
Figure 16 : Représentation graphique du test de sensibilité des souches bactériennes vis-à- vis des trois antibiotiques	46
Figure 17 : Effet de l'huile essentielle de <i>Pinus sylvestris</i> sur les six souches bactériennes testées.....	48
Figure 18 : Effet de l'huile essentielle de <i>Pelargonium asperum</i> sur les six souches bactériennes testées	50
Figure 19 : Représentation graphique des résultats du test de sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis des deux huiles essentielles <i>Pinus sylvestris</i> et <i>Pelargonium asperum</i>	52

Figure 20: Résultats du test de l'antibiogramme avec la nisine à 1,5mg/ml dans de l'HCL à 0,02N	57
Figure 21: Représentation graphique des résultats du test de sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis de la nisine dissoute dans l'HCL à 0,02N	58
Figure 22: Témoins négatifs réalisés avec le DMSO et HCL à 0,02N sur les six bactéries testées	64
Figure 23: Résultats de la combinaison de 50% d'H. E de <i>Pinus sylvestris</i> avec 50% de nisine ...	65
Figure 24: Résultats de la combinaison de 75% d'H.E de <i>Pinus sylvestris</i> avec 25% de nisine....	66
Figure 25: Résultats de la combinaison de 25% d'H.E de <i>Pinus sylvestris</i> avec 75 % de nisine...	67
Figure 26: Représentation graphique des résultats du test de sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis de l'H.E de <i>Pinus sylvestris</i> combinée à la nisine.....	68
Figure 27: Résultats de la combinaison de 50% d'H.E de <i>Pelargonium asperum</i> avec 50% de nisine	70
Figure 28: Résultats de la combinaison de 75% d'H.E de <i>Pelargonium asperum</i> avec 25% de nisine	71
Figure 29: Résultats de la combinaison de 25% d'H.E de <i>Pelargonium asperum</i> avec 75% de nisine	72
Figure 30 : Représentation graphique des résultats du test de sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis de l'H.E de <i>Pelargonium asperum</i> combinée à la nisine	73

Liste des tableaux

Tableau 1 : Tableau descriptif des différentes bactéries utilisées dans cette étude	35
Tableau 2 : Tableau descriptif des deux huiles essentielles utilisées dans cette étude	36
Tableau 3 : Valeurs des dilutions utilisées pour déterminer les CMI d'H.E	39
Tableau 4 : Caractères morphologiques étudiés pour la vérification des souches bactériennes	43
Tableau 5 : Résultats des diamètres d'inhibition en mm (moyenne \pm l'écart type) des antibiotiques sur les six souches bactériennes	46
Tableau 6 : Résultats des diamètres d'inhibition en mm (moyenne \pm l'écart type) de l'H.E de <i>Pinus sylvestris</i> sur les six souches bactériennes testées.....	49
Tableau 7 : Résultats des diamètres d'inhibition en mm (moyenne \pm l'écart type) de l'H.E de <i>Pelargonium asperum</i> sur les six souches bactériennes testées	51
Tableau 8 : Tableau récapitulatif des résultats du test de sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis des deux huiles essentielles testées.....	51
Tableau 9 : Tableau récapitulatif des résultats du test de sensibilité des souches bactériennes à la concentration de 1,5mg/ml de nisine dissoute dans de l'HCL à 0,02N	58
Tableau 10: Les valeurs des CMI des deux huiles essentielles de <i>Pinus sylvestris</i> et <i>Pelargonium asperum</i> sur les bactéries testées (<i>S.aureus</i> (ATCC43300), <i>S. aureus</i> et <i>E. coli</i>) en μ l/ml	61
Tableau 11 : Tableau récapitulatif des résultats du test de sensibilité des souches bactériennes aux trois combinaisons réalisées avec l'H. E de <i>Pinus sylvestris</i> et la nisine....	68
Tableau 12 : Tableau récapitulatif des résultats du test de sensibilité des souches bactériennes aux trois combinaisons réalisées avec l'H. E de <i>Pelargonium asperum</i> et la nisine	73

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 1

Première partie : Synthèse bibliographique

I. Généralités sur les huiles essentielles

1. Définition des huiles essentielles	3
2. Répartition et localisation des huiles essentielles dans la plante	3
3. Rôle des huiles essentielles dans la plante	4
4. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles	5
5. Composition chimique des huiles essentielles	5
5.1. Les terpénoïdes	5
5.2. Les composés aromatiques	6
5.3. Les composés d'origines diverses	7
6. Les chémotypes	7
7. Les procédés d'extraction	8
7.1. La distillation	8
7.2. Extraction par micro-ondes	10
7.3. Extraction par solvants	11
7.4. Extraction par les corps gras	12
7.5. Extraction au CO ₂ supercritique	12
8. Activités biologiques des huiles essentielles	13
8.1 Activités antibactériennes des huiles essentielles	13
8.1.1. Activité bactéricide et bactériostatique	14
8.1.2. Facteurs influençant l'activité antimicrobienne des huiles essentielles	14
8.2. Activités antifongique	14
8.3. Activité antivirale	15
8.4. Activité pesticide	15

8.5. Activités anti-inflammatoires	16
8.6. Activités antioxydants	16
9. Domaines d'utilisation des huiles essentielles	16
9. 1. Phytothérapie.....	16
9. 2. Utilisation en aéro-ionisation	17
9. 3. Parfumerie et cosmétologie.....	17
9.4. Industrie alimentaire.....	17
10. Toxicité des huiles essentielles... ..	18
11. Conservation des huiles essentielles	18

II. Résistance bactérienne aux antibiotiques

1. Définition de la résistance	20
2. Types de résistance	20
2.1. Résistance naturelle	20
2.2. Résistance acquise	20
3. Mécanismes de résistance	21
3.1. Inactivation enzymatique de l'antibiotique	22
3.2. Modification ou remplacement de la cible de l'antibiotique	23
3.3. Pompes à efflux.....	23
3.4. Perméabilité réduite	24
3.5. Protection de la cible de l'antibiotique.....	26
3.6. Piégeage de l'antibiotique	26
4. Place des plantes dans la lutte contre la résistance	27

III. Notions sur la nisine

1. Définition et caractéristiques de la nisine	28
2. Structure et propriétés physico-chimiques	28
3. Mode d'action.....	29
4. Toxicité de la nisine.....	30
5. Intérêts de la nisine.....	31

VI. Description des plantes étudiées

1. <i>Pinus sylvestris</i>	32
1.1. Classification	32
1.2. Description botanique.....	32
1.3. Huile essentielle de <i>Pinus sylvestris</i>	33
2. <i>Pelargonium asperum</i>	33
2.1. Classification	33
2.2. Description botanique.....	34
2.3. Huile essentielle de <i>Pelargonium asperum</i>	34

Deuxième partie : Etude expérimentale

I. Matériel et méthodes

1. Matériel.....	35
1.1. Microorganismes testés	35
1.2. Milieux de culture	35
1.3. Antibiotiques utilisés	35
1.4. La Nisine	36
1.5. Les huiles essentielles.....	36
1.6. Appareillage.....	36
2. Méthodes	36
2.1. Tests de confirmation des souches bactériennes	36
2.1.1. Tests microbiologiques.....	36
2.2. Préparation de l'inoculum	37
2.2.1. Préparation de pré-culture	37
2.2.2. Préparation de la suspension bactérienne.....	37
2.3. Etude de l'activité antibactérienne	38
2.3.1. Test de sensibilité des souches bactériennes aux huiles essentielles	38
2.3.2. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)	39
2.3.2.1. Technique de macrodilution en milieu liquide	39
2.4. Etude de l'activité antibactérienne de la nisine	40
2.5. Etude de l'effet de la combinaison des huiles essentielles avec la nisine	40
2.6. Analyses statistiques	42

II. Résultats et discussion

1. Résultats des tests de vérification des souches bactériennes	43
2. Résultats des témoins réalisés par la méthode de diffusion sur gélose	43
2.1. Résultats des témoins négatifs réalisés avec le DMSO	43
2.2. Résultats des témoins positifs (antibiogramme)	44
3. Résultats du test de sensibilité des souches bactériennes aux deux huiles essentielles.....	47
3.1. Résultats du test de sensibilité des souches bactériennes à l'H.E de <i>Pinus</i> <i>sylvestris</i>	47
3.2. Résultats du test de sensibilité des souches bactériennes à l'H.E de <i>Pelargonium</i> <i>asperum</i>	49
4. Résultats du test de sensibilité des souches bactériennes à la nisine	56
5. Concentrations minimales inhibitrices (CMI).....	61
5.1. Résultats des CMI réalisées avec <i>Pinus sylvestris et Pelargonium asperum</i>	61
6. Résultats de la combinaison des huiles essentielles avec la nisine.....	63
6.1. Résultats des témoins négatifs réalisés avec le DMSO et HCL à 0,02N.....	63
6.2. Résultats de la combinaison de l'H.E de <i>Pinus sylvestris</i> avec de la nisine	65
6.3. Résultats de la combinaison de l'H.E de <i>Pelargonium asperum</i> avec de la nisine	69
Conclusion et perspectives	76

Références bibliographiques

Annexes

La prolifération de bactéries résistantes est devenue une préoccupation majeure dans le domaine de la santé. En devenant insensibles à tout traitement, ces bactéries limitent la gamme d'antibiotiques disponibles en thérapeutique médicale. La situation est d'autant plus alarmante que les infections causées par les bactéries résistantes entraînent souvent une prolongation de l'état pathologique et un accroissement du taux de mortalité. L'acquisition de ces multiples résistances a engendré une perte d'efficacité de l'antibiothérapie pour, finalement, conduire à une impasse thérapeutique.

Aussi, au vu de la propagation du phénomène de résistance et du nombre limité d'antibiotiques en cours de développement, la découverte de nouveaux agents antibactériens, est devenue plus qu'indispensable. Pour être innovants et contourner les mécanismes de résistance bactériens, les antibiotiques de demain devront viser de nouvelles « cibles » d'action chez les bactéries. 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.

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), près de 80 % des populations dépendent de la médecine traditionnelle pour des soins de santé primaire (O.M.S, 2002). Des avantages économiques considérables dans le développement de cette médecine et dans l'utilisation des plantes médicinales pour le traitement des diverses maladies ont été constatés (MUTHU *et al.*, 2006). Par conséquent, la recherche des principes actifs potentiels de la plante est plus que jamais d'actualité.

Les huiles essentielles extraites des plantes aromatiques constituent une source potentielle de molécules naturelles bioactives. Elles font l'objet d'étude pour leur éventuelle utilisation comme alternative pour le traitement des maladies infectieuses et pour la protection des aliments.

Dans les années 1990, la découverte de métabolites bioactifs d'origine microbienne a progressé de manière exponentielle grâce aux progrès technologiques. Malheureusement, parmi les métabolites découverts, nombreux sont des analogues de molécules déjà connues, des composés n'ayant pas d'activité antibiotique ou encore des composés mineurs. La découverte de nouvelles familles chimiques innovantes se raréfie (BERDY, 2005). Pourtant de nouveaux besoins émergent, des germes multirésistants (SHARMA *et al.*, 2005) et de

nouveaux virus apparaissent. Face à ces besoins, de nouveaux composés chimiques doivent donc être identifiés et la recherche de nouvelles molécules bioactives évolue.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail est l'évaluation *in vitro* l'activité antibactérienne de deux huiles essentielles provenant de deux espèces ; *Pinus sylvestris* appartenant à la famille des Pinaceae et *Pelargonium asperum* de la famille des Geraniaceae, et en combinaison avec la nisine pour rechercher un éventuel effet de synergie vis-à-vis de différentes souches bactériennes pathogènes.

I. Généralités sur les huiles essentielles

1. Définition des huiles essentielles

Plusieurs définitions disponibles d'une huile essentielle convergent sur le fait que les huiles essentielles, communément appelées « essence », sont des produits de composition généralement assez complexe, renferment les principes odorants volatils contenus dans les végétaux. Elle diffère des huiles fixes (huile d'olive,...) et des graisses végétales par leur caractère volatil ainsi que leur composition chimique (BALZ, 1986).

AFNOR NFT 75-006 (1998) définit les huiles essentielles comme produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par procédé mécanique à partir de l'épiderme des *Citrus*, soit par distillation sèche. L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques pour les deux premiers modes d'obtention; elle peut subir des traitements physiques n'entraînant pas de changement significatif de sa composition. (BRUNETON, 2008).

2. Répartition et localisation des huiles essentielles dans la plante

Les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs. Les genres capables d'élaborer les constituants qui les composent sont répartis dans une cinquantaine de familles botaniques parmi lesquelles les Lamiacées, les Astéracées, les Rutacées, les Cannelacées, les Lauracées, les Myrtacées et les Zingibéracées (BRUNETON, 1999). Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes: fleurs (rose) feuilles (citronnelle, eucalyptus, laurier), écorces (cannelier), bois (bois de rose, santal), racines (vetiver), rhizomes (cucurbitacées, gingembre), fruits (anis, badiane) et graines (muscade). (SANGWAN *et al.*, 2001). La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées, souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante : cellules à huiles essentielles des Lauracées ou des Zingibéracées, poils sécréteurs des Lamiacées, poches sécrétrices des Myrtacées ou des Rutacées, canaux sécréteurs des Apiacées ou des Astéracées.

3. Rôle des huiles essentielles dans la plante

Les plantes possèdent des métabolites dits « secondaires » par opposition aux métabolites primaires que sont les protéines, les glucides et les lipides. Ces composés diffèrent en fonction des espèces et, bien que leurs rôles soient encore mal connus, il est cependant clair qu'ils interviennent dans les relations qu'entretient la plante avec les organismes vivants qui l'entourent. Ils sont probablement des éléments essentiels de la coévolution des plantes avec les organismes vivants, tels que parasites, pathogènes et prédateurs, mais aussi pollinisateurs et disséminateurs. Ces différentes relations ont donné lieu à une extrême diversification des composés secondaires.

Les travaux de CROTEAU(1977) puis ceux de CROTEAU et HOOPER (1978) ont montré que, bien qu'étant des produits du métabolisme secondaire, les composants volatils auraient en fait un rôle mobilisateur d'énergie lumineuse et de régulateur thermique au profit de la plante. Certains terpènes jouent un rôle important et varié dans la relation des plantes avec leur environnement. Ainsi le 1,8-cinéole et le camphre inhibent la germination des organes responsables de la prolifération des infections ou la croissance des agents pathogènes issus de ces organes.

Pour certains auteurs, les huiles essentielles constitueraient « les déchets » du métabolisme cellulaire de la plante. Pour d'autres, elles serviraient à attirer les insectes pour permettre la fécondation ou alors à les éloigner de la plante. L'attrait des insectes pour les plantes à fleurs en vue de la pollinisation est également crédité aux huiles essentielles que ces plantes contiennent. Les huiles essentielles constitueraient enfin un moyen de défense de la plante vis-à-vis des prédateurs tels que les microorganismes (bactéries et champignons) et les herbivores (BRUNETON, 1999). Dans la nature, les huiles essentielles jouent un rôle important dans la protection des plantes en tant que substances antibactérienne, antiviral, antifongique, insecticide et aussi contre les herbivores en réduisant leur appétit pour une telle plante. Elles peuvent attirer aussi des insectes en favorisant la dispersion de pollens et graines, ou au contraire repousser d'autres indésirables (BAKKALI *et al.*, 2008).

4. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles

On trouve généralement les HE incolores ou jaune pâle à l'état liquide à température ordinaire.

Toutes les HE sont volatiles, odorantes et inflammables. Leur densité est le plus souvent inférieure à 1. Seules trois HE officinales ont une densité supérieure à celle de l'eau, ce sont les HE de cannelle, de girofle et de saffras.

Elles sont peu solubles dans l'eau, solubles dans les alcools et dans la plupart des solvants organiques. Elles sont altérables et très sensibles à l'oxydation (JACQUES et PALTZ, 1997).

5. Composition chimique des huiles essentielles

L'étude de la composition chimique des huiles essentielles révèle qu'il s'agit de mélanges complexes et variables de constituants appartenant exclusivement à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : les terpénoïdes et les composés aromatiques dérivés du phénylpropane (TEISSEIRE, 1991).

5. 1. Les terpénoïdes

Le terme terpène rappelle la toute première extraction de ce type de composé dans l'essence de térébenthine. Dans le cas des huiles essentielles, seuls les terpènes les plus volatils, c'est à dire, ceux dont la masse moléculaire n'est pas élevée sont observés. Ils répondent dans la plupart de cas à la formule générale $(C_5H_8)_n$. Suivant les valeurs de n, on a les hémiterpènes (n=1), les monoterpènes (n=2), les sesquiterpènes (n=3), les triterpènes(n=6), les tétraterpènes (n=8) et les polyterpènes. Les constituants des huiles essentielles sont très variés .On y trouve en plus de terpènes, des hydrocarbures, des esters, des lactones, des aldéhydes, des alcools, des acides, des cétones, des phénols, des oxydes et autres (TEISSEIRE, 1991).

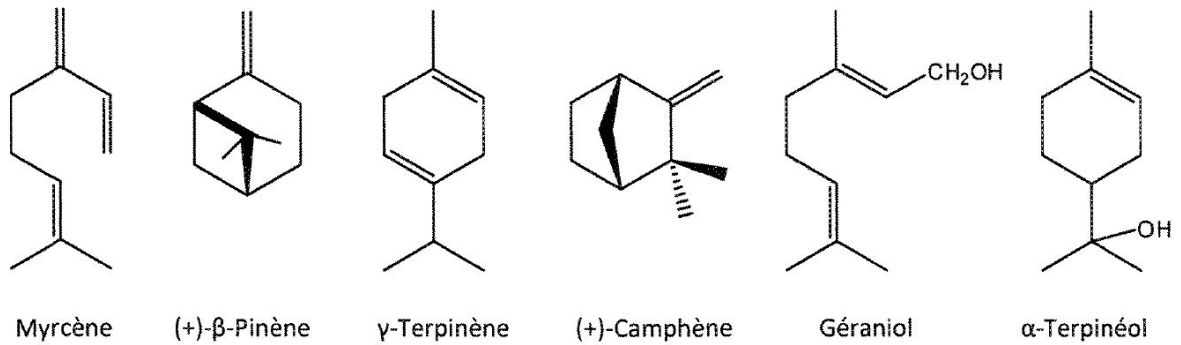


Figure 1 : Exemples de structures de monoterpènes (MODZELEWSKA *et al.*, 2005)

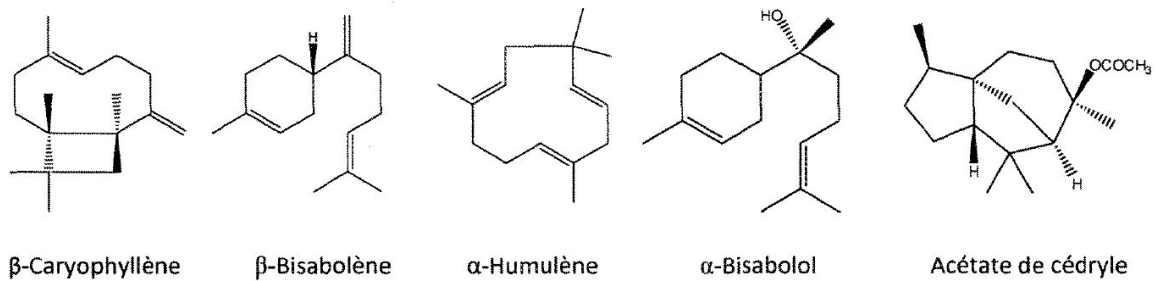


Figure 2 : Exemples de structures de sesquiterpènes (MODZELEWSKA *et al.*, 2005)

5. 2. Les composés aromatiques

Contrairement aux dérivés terpéniques, les composés aromatiques sont moins fréquents dans les huiles essentielles. Très souvent, il s'agit d'allyle et de propénylphénol. Ces composés aromatiques constituent un ensemble important car ils sont généralement responsables des caractères organoleptiques des huiles essentielles. Nous pouvons citer en exemple l'eugénole qui est responsable de l'odeur du clou de girofle (KUNLE et OKOGUM, 2003).



Figure 3 : Exemples de structures de composés dérivés du phénylpropane (KURKIN, 2003).

5. 3. Les composés d'origines diverses

Compte tenu de leur mode d'extraction, les huiles essentielles peuvent renfermer divers composés aliphatiques, généralement de faible masse moléculaire, entraînés lors de l'hydro distillation. Ces produits peuvent être azotés ou soufrés (INOUYE *et al.*, 2003).

6. Les Chémotypes

La connaissance des chémotypes d'une huile essentielle et leur comportement est fondamentale car elle permet d'envisager l'activité pharmacologique, de prévoir aussi la pharmacocinétique et la biodisponibilité.

Pour une même espèce botanique, la composition chimique de l'huile essentielle n'est pas immuable. Les huiles essentielles sont élaborées par les plantes aromatiques au sein des cellules sécrétrices. Leur élaboration est totalement tributaire du rayonnement solaire en l'absence duquel le rendement en produits aromatiques et leur nature sont affectés. En sa présence, et tout particulièrement en fonction de la présence de tel ou tel rayonnement, les types de composants pourront varier considérablement au sein d'une même espèce. Par exemple, le basilic cultivé en pleine lumière à Madagascar a un taux de chavicol de 57% alors que la même plante cultivée à l'abri de la lumière en contient 74% (FRANCHOMME et

PENOËL, 1990). Cette variabilité peut être influencée également par la composition du sol et la position géographique; le *Lippia mutiflora* récoltée au Togo a révélé les chémotypes à citral, à thymol (acétate de thymyle), à para-cymène, à 1-8 cinéole (AZANLENKO, 1995).

7. Les procédés d'extraction

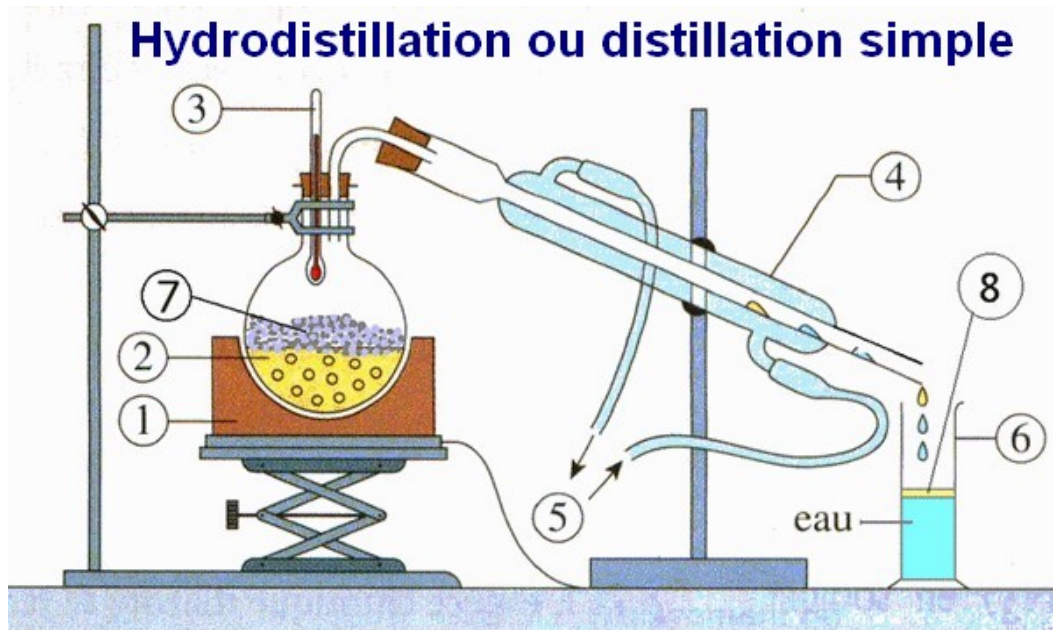
7.1. La distillation

La technique d'extraction des huiles essentielles utilisant l'entraînement des substances aromatiques grâce à la vapeur d'eau est de loin la plus utilisée à l'heure actuelle. La méthode est basée sur l'existence d'un azéotrope de température d'ébullition inférieure aux points d'ébullition des deux composés, l'huile essentielle et l'eau, pris séparément. Ainsi, les composés volatils et l'eau distillent simultanément à une température inférieure à 100 °C sous pression atmosphérique normale. En conséquence, les produits aromatiques sont entraînés par la vapeur d'eau sans subir d'altérations majeures (FRANCHOMME et PENOËL, 1990). Il existe précisément trois différents procédés utilisant ce principe: l'hydrodistillation, l'hydrodiffusion et l'entraînement à la vapeur d'eau. Beaucoup de confusions règnent autour de l'utilisation de ces trois termes. Quelques éclaircissements s'imposent donc.

Tout d'abord, l'hydrodistillation (*water distillation*). Il s'agit de la méthode la plus simple et de ce fait la plus anciennement utilisée. Le matériel végétal est immergé directement dans un alambic rempli d'eau placé sur une source de chaleur. Le tout est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées dans un réfrigérant et l'huile essentielle se sépare de l'hydrolat par simple différence de densité. L'huile essentielle étant plus légère que l'eau (sauf quelques rares exceptions), elle surnage au-dessus de l'hydrolat.

Ensuite, la distillation par entraînement à la vapeur d'eau (*steam distillation*). Dans ce type de distillation, le matériel végétal ne macère pas directement dans l'eau. Il est placé sur une grille perforée au travers de laquelle passe la vapeur d'eau.

La vapeur endommage la structure des cellules végétales et libère ainsi les molécules volatiles qui sont ensuite entraînées vers le réfrigérant. Cette méthode apporte une amélioration de la qualité de l'huile essentielle en minimisant les altérations hydrolytiques: le matériel végétal ne baignant pas directement dans l'eau bouillante (FRANCHOMME et PENOËL, 1990).



- | | |
|-------------------|---------------------------------|
| 1- Chauffe ballon | 5- Entrée et sortie d'eau |
| 2- Ballon | 6- Erlenmeyer |
| 3- Thermomètre | 7- Matière à extraire l'essence |
| 4- Réfrigérant | 8- Couche d' H.E |

Figure 4 : Schéma du principe de la technique d'hydrodistillation (LUCCHESI, 2005)

Enfin, la troisième technique est l'hydrodiffusion. Cette technique relativement récente est particulière. Elle consiste à faire passer, du haut vers le bas (*per descendum*) et à pression réduite, la vapeur d'eau au travers de la matrice végétale. L'avantage de cette méthode est d'être plus rapide donc moins dommageable pour les composés volatils.

Cependant, l'huile essentielle obtenue avec ce procédé contient des composés non volatils ce qui lui vaut une appellation spéciale: « essence de percolation » (FRANCHOMME *et al.*, 1990 ; RICHARD, 1992).

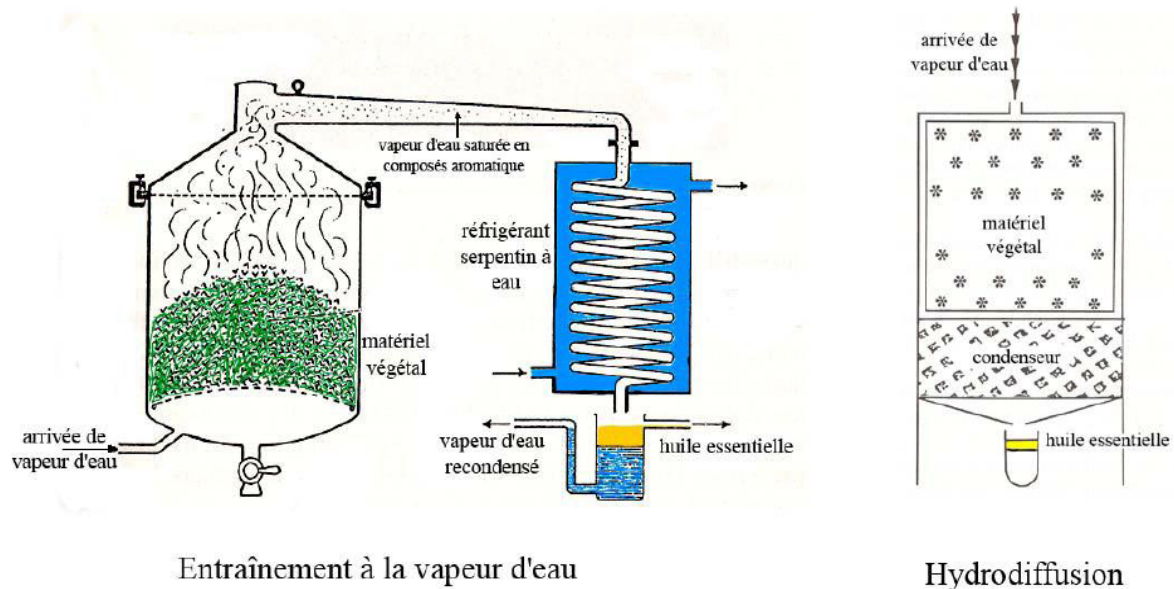


Figure 5: Montages pour l'entraînement à la vapeur d'eau et l'hydrodiffusion

(NAITACHOUR, 2012).

7. 2. Extraction par micro-ondes

Au début des années 1990 est apparue une toute nouvelle technique appelée hydrodistillation par micro-ondes sous vide (Figure 6). Dans ce procédé, la matrice végétale est chauffée par micro-ondes dans une enceinte close dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle. Les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau formée à partir de l'eau propre à la plante. Ils sont ensuite récupérés à l'aide des procédés classiques de condensation, refroidissement et décantation. Ce procédé permet un gain de temps (temps d'extraction divisé par 5 à 10) et d'énergie (température plus basse) considérable. En guise d'exemple, l'extraction par micro-ondes de deux kilos de *Mentha piperita* permet d'obtenir environ 1% d'huile essentielle en 15 minutes alors que deux heures d'hydrodistillation sont nécessaires pour obtenir un rendement similaire à partir de la même masse de plante

(MENGAL *et al.*, 1993). La composition de l'huile essentielle obtenue par ce procédé est bien souvent semblable à celle obtenue avec un procédé d'entraînement à la vapeur traditionnel.

Toutefois, une plus grande proportion de composés oxygénés est généralement observée dans les huiles essentielles extraites par microondes. Ceci est dû à la faible quantité d'eau présente dans le système et à la rapidité du processus de chauffage. Ainsi, les dégradations thermiques et hydrolytiques des composés oxygénés sont limitées (BENDAHOU *et al.*, 2007; LUCCHESI *et al.*, 2007).

Cette technique présente donc beaucoup d'avantages: technologie verte, économie d'énergie et de temps, investissement initial réduit et dégradations thermiques et hydrolytiques minimisées (MENGAL *et al.*, 1993; LUCCHESI *et al.*, 2004).

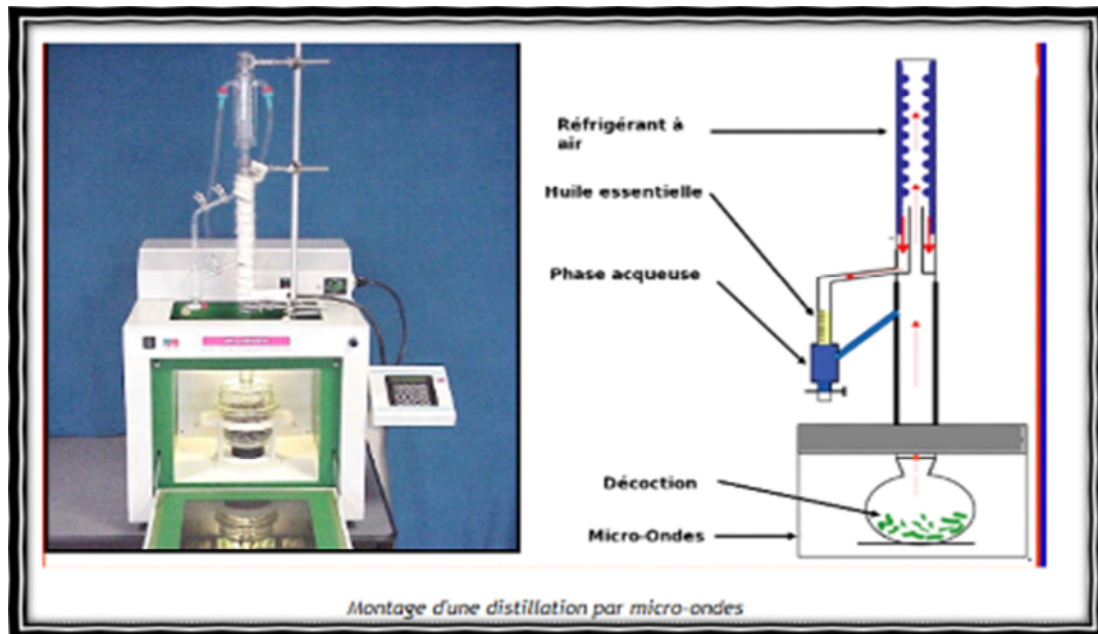


Figure 6 : Système d'extraction des huiles essentielles par micro-ondes (LUCCHESI *et al.*, 2007) .

7. 3. Extraction par solvants

La méthode de cette extraction est basée sur le fait que les essences aromatiques sont solubles dans la plupart des solvants organiques. L'extraction se fait dans des extracteurs de construction variée, en continu, semi-continu ou en discontinu. Le procédé consiste à épuiser

le matériel végétal par un solvant à bas point d'ébullition qui par la suite, sera éliminé par distillation sous pression réduite. L'évaporation du solvant donne un mélange odorant de consistance pâteuse dont l'huile est extraite par l'alcool. L'extraction par les solvants est très coûteuse à cause du prix de l'équipement et de la grande consommation des solvants. Un autre désavantage de cette extraction par les solvants est leur manque de sélectivité; de ce fait, de nombreuses substances lipophiles (huiles fixes, phospholipides, caroténoïdes, cires, coumarines, etc.) peuvent se retrouver dans le mélange pâteux et imposer une purification ultérieure (BRIAN, 1995).

7. 4. Extraction par les corps gras

La méthode d'extraction par les corps gras est utilisée en fleurage dans le traitement des parties fragiles de plantes telles que les fleurs, qui sont très sensibles à l'action de la température. Elle met à profit la liposolubilité des composants odorants des végétaux dans les corps gras. Le principe consiste à mettre les fleurs en contact d'un corps gras pour le saturer en essence végétale. Le produit obtenu est une pommade florale qui est ensuite épuisée par un solvant qu'on élimine sous pression réduite. Dans cette technique, on peut distinguer l'enfleurage où la saturation se fait par diffusion à la température ambiante des arômes vers le corps gras et la digestion qui se pratique à chaud, par immersion des organes végétaux dans le corps gras (BRIAN, 1995).

7. 5. Extraction au CO2 supercritique

L'originalité de cette technique d'extraction réside dans le type de solvant employé: le CO2 supercritique. Au-delà du 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 bon pouvoir d'extraction, qui plus est, facilement modulable en jouant sur les conditions de température et de pression. Cette technique présente énormément d'avantages. Tout d'abord, le CO2 supercritique est un solvant idéal puisqu'il est naturel, inerte chimiquement, inflammable, non toxique, sélectif, aisément disponible et peu coûteux. De plus, il s'élimine facilement de l'extrait sans laisser de résidus. Outre ces avantages, le principal point fort est la qualité irréprochable de l'extrait puis qu'aucun réarrangement ne s'opère lors du processus. Son unique point faible est le coût très élevé de son installation (PELLERIN, 1991). En jouant sur les conditions de température et de pression, il est possible de rendre l'extraction plus

sélective aux composés odorants et ainsi obtenir des extraits de composition tout à fait semblable aux huiles essentielles, non chargés en molécules non volatils. Ainsi, la température et la pression à ne pas dépasser pour extraire uniquement les principes volatils est 60 °C et 60 bars (RICHARD, 1992). Cette technique est aujourd'hui considérée comme la plus prometteuse car elle fournit des extraits volatils de très haute qualité et qui respecterait intégralement l'essence originelle de la plante (WENQIANG *et al.*, 2007) .

8. Activités biologiques des huiles essentielles

8.1. Activités antibactériennes des huiles essentielles

La première mise en évidence de l'action des huiles essentielles contre les bactéries a été réalisée en 1881 par Delacroix (BOYLE, 1955). Depuis, de nombreuses huiles ont été définies comme antibactériennes.

Leur spectre d'action est très étendu, car elles agissent contre un large éventail de bactéries, y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques. Cette activité est par ailleurs variable d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre (KALEMBA et KUNICKA, 2003). Les huiles essentielles agissent aussi bien sur les bactéries Gram positives que sur les bactéries Gram négatives. Toutefois, les bactéries Gram négatives paraissent moins sensibles à leur action et ceci est directement lié à la structure de leur paroi cellulaire (BURT, 2004). Il existe cependant quelques exceptions. Les bactéries Gram négatives *Aeromonas hydrophila* et *Campylobacter jejuni* ont été décrites comme particulièrement sensibles à l'action des huiles essentielles. La bactérie reconnue comme la moins sensible à leurs effets reste néanmoins la bactérie Gram négative *P. aeruginosa* (DORMAN et DEANS, 2000).

La croissance des bactéries, résistantes et multi-résistantes aux antibiotiques, peut être inhibée par certaines huiles essentielles. Les huiles d'agrumes, de lavande, de menthe, de genévrier, de l'arbre à thé, de thym et d'eucalyptus se révèlent particulièrement efficaces contre les staphylocoques dorés résistants à la méthicilline (SARM) (MAY *et al.*, 2000 ; TOHIDPOUR *et al.*, 2010) et les entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) . Les huiles essentielles, isolées de deux espèces de thym de Corée, *Thymus magnus* et *Thymus quinquecostatus*, sont également capables d'inhiber la croissance de bactéries résistantes

comme *Streptococcus pneumoniae*, *Samonella typhimurium*, *Salmonella entereditis* et *S. aureus* (SHIN et KIM, 2005).

8.1.1. Activité bactéricide et bactériostatique

L'activité antibactérienne des huiles essentielles a été la plus étudiée. On distingue deux sortes d'effets des huiles essentielles sur ces microorganismes :

- Effet bactéricide (bactéricidie) : exerçant une activité létale
- Effet bactériostatique (bactériostase) : entraînant une inhibition de la croissance.

L'activité bactériostatique est souvent plus assimilable aux huiles essentielles que l'activité bactéricide. Cependant il a été démontré que certains constituants chimiques des huiles essentielles ont des propriétés bactéricides (KUNLE et OKOGUN, 2003 ; WALSH et MAILLARD, 2003). En effet, des dommages au niveau des cellules de différents microorganismes ont été rapportés, illustrés par microscopie électronique. Citons l'effet bactéricide des huiles essentielles riches en monoterpénols et en phénols sur *Staphylococcus aureus*, ou encore celui de l'*Origanum compactum* sur *Escherichia coli* (BURT et REINDERS, 2003).

8.1.2. Facteurs influençant l'activité antimicrobienne des huiles essentielles

L'efficacité antimicrobienne des huiles essentielles dépend de deux principaux paramètres : l'huile essentielle et sa composition chimique d'une part car les composés chimiques connus pour leur efficacité antimicrobienne et leur large spectre sont les phénols (thymol, carvacrol et eugénol), les alcools, (α -terpineol, terpinen-4-ol, linalol), les aldéhydes, les cétones et plus rarement les carbures, et le microorganisme (type, structure...) d'autre part (COSENTINO et TUBEROSO, 1999 ; DORMAN et DEANS, 2000).

8.2. Activités antifongique

Les huiles essentielles ont un large spectre d'action antiseptique, puisqu'elles inhibent aussi bien la croissance bactérienne que la croissance fongique, comme les moisissures allergisantes, les dermatophytes et les champignons opportunistes. Leur activité antimicrobienne est principalement en fonction de leur composition chimique (MIBARKI, 2010). La question qui se pose est de savoir si certains composés chimiques des H.Es sont

plus actifs que d'autres, ainsi, le thymol ; le composé majeur de l'H.E de thym, utilisé seul sur les espèces : *Aspergillus*, *Penicilium*, *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Rhizopus* et *Mucor*, montre une activité significativement plus forte que l' H.E de thym (*Thymus vulgaris*) prise dans son ensemble (DEGRYSE *et al.*,2008).

L'action antifongique de l'huile essentielle de *cladanthus mixtus*, sur trois champignons, *Aspergillus niger*, *Penicillium parasiticus* et *Tramets pini*, les resultats ont montré que les trois champignons sont complètement inhibés à 1/2000 (v/v) agar 2%. (SATRANI *et al.*, 2012).

MANAHAR *et al.* (2001) ont rapporté que l'huile essentielle d'origanum a un effet fongicide sur *Candida albicans in vitro*.

8.3. Activité antivirale

Les huiles essentielles parviennent au niveau cellulaire et participent à la destruction des agents pathogènes et à l'élimination des déchets du métabolisme (ZHIRI et BAUDOUX ,2006).

De nombreuses familles de molécules ont montré *in vitro* une activité antivirale, et parmi elles, les monoterpénols et les monoterpénols. Les virus sont généralement fortement sensibles aux molécules aromatiques, et de nombreuses pathologies sévères virales montrent des améliorations importantes avec leur utilisation. De plus, les cellules saines des sujets utilisant les H.Es, acquièrent une résistance toute particulière vis-à-vis de la pénétration virale, développant ainsi le système d'autodéfense (ZHIRI, 2006).

Les H.Es sont sélectivement absorbées et perturbent les fonctions des membranes biologiques de la cellule, sur la mitochondrie et autres organites vitaux pour tous les organismes hormis les virus (les H.Es ne sont actives que sur les virus à enveloppe comme celui de la grippe et du VIH (Virus de l'Immunité déficience Humaine) (INOUYE et ABE, 2007).

8.4. Activité pesticide

Malgré les nombreuses molécules synthétiques susceptibles d'être utilisées, la protection des végétaux peut également se faire avec certaines essences naturelles. En effet, les pesticides sont très diversifiés et se classent selon leur activité en insecticides, molluscides, nématocides, germicides. Certaines huiles sont reconnues pour leur efficacité sur les

champignons phytopathogènes : tel est le cas des essences de Citrus sur la croissance mycélienne de *Phaeoramularia angolensis* (CHENG *et al.*, 2004).

8.5. Activités anti-inflammatoires

Les constituants des huiles essentielles tels que les monoterpènes hydrocarbonés, les sesquiterpènes hydrocarbonés et les alcools sesquiterpéniques ont montré une activité inhibitrice de la 5-lipoxygénase qui est une enzyme responsable de la production de leucotriènes suspectés de jouer un rôle importante dans la maladie d'Alzheimer (CHAO *et al.*, 2005).

8.6. Activités antioxydants

Certains constituants des huiles essentielles présentent un pouvoir antioxydant très marqué et sont aujourd'hui commercialisés : c'est le cas de l'eugénol, du thymol, du carvacrol, etc. Les résultats déjà publiés montrent que les huiles essentielles constituent une bonne source d'antioxydants naturels recherchés pour leur innocuité relative (BURITS et BUCAR, 2000 ; CANDAN *et al.*, 2003; TEPE *et al.*, 2005).

9. Domaines d'utilisation des huiles essentielles

9. 1. Phytothérapie

L'aromathérapie est une branche de la phytothérapie qui utilise les HE pour traiter un certain nombre de maladies.

Le terme aromathérapie vient du chimiste Français René-Maurice Gattefosse, qui a utilisé l'HE de lavande pendant la première guerre mondiale pour soigner des blessures et des infections. Selon lui, la lavande était plus appropriée pour traiter les infections que plusieurs antiseptiques utilisés à cette époque. Cette spécialité préoccupe de plus en plus des médecins et des pharmaciens qui ont publié un nombre important d'ouvrages d'aromathérapie (ROULIER, 1992).

Les HE sont largement utilisées pour traiter certaines maladies internes et externes (infections d'origine bactérienne ou virale, troubles humoraux ou nerveux). En médecine dentaire, plusieurs HE ont donné des résultats cliniques très satisfaisantes dans la désinfection de la pulpe dentaire, ainsi que dans le traitement et la prévention des caries (KATO *et al.*, 1990 ; SCHWARTZ *et al.*,1992 ; SIVROPOULOU *et al.*,1996). La listerine qui est une

solution constituée d'HE de thymol et d'eucalyptol possède une grande activité bactéricide sur les microorganismes de la salive et de la plaque dentaire (KATO *et al.*, 1990).

Les huiles essentielles de thym et de romarin ont été utilisées pour soulager la fatigue, les maux de tête, les douleurs musculaires et quelques problèmes respiratoires. Malheureusement, ces prescriptions ne possèdent pas de bases scientifiques rigoureuses car elles sont souvent tirées de pratiques et de tâtonnements empiriques (VALNET, 1974).

Des études très récentes ont montré que le géraniole a une action sur les cellules cancéreuses du colon , en plus de l'activité anti-inflammatoire, récemment mise en évidence (SIANI *et al.*, 1999).

9. 2. Utilisation en aéro-ionisation

Dans les locaux, on peut aseptiser l'atmosphère avec un ionisateur d'huiles essentielles. Il se forme ainsi des aérosols vrais aromatiques, ionisés, créant de l'oxygène naissant ionique, fortement bactéricide, tout en contribuant à dépolluer l'atmosphère.

Elles servent dans la fabrication du " paragerm ", solution volatile à base d'essences naturelles (citron, lilas) à activité bactéricide, acaricide et fongistatique qui s'est révélée sans aucune toxicité pour l'homme aux doses utilisées (MALLEA *et al.*, 1979).

9. 3. Parfumerie et cosmétologie.

L'utilisation des HE dans les crèmes et les gels permet de préserver ces cosmétiques grâce à leur activité antiseptique et antioxydante, tout en leur assurant leur odeur agréable (MARUZZELLA , 1962 ; ROULIER,1992 ; VARGAS *et al.*,1999).

9. 4. Industrie alimentaire

En industrie alimentaire, on cherche toujours à avoir une conservation saine et de longue durée pour les produits consommés ainsi qu'une qualité organoleptique meilleure. Une nouvelle technique pour réduire la prolifération des micro-organismes réside dans l'utilisation des HE (LIS-BALCHIN *et al.*,1998 ; LACHOWICZ *et al.*,1998) . Les plantes aromatiques et leur HE sont utilisées dans la conservation des denrées alimentaires. Parmi le groupe diversifié des constituants chimiques des HE (HAMMER *et al.*, 1999), le carvacrol,

qui exerce une action antimicrobienne bien distinguée, est additionné à différents produits alimentaires en industrie agro-alimentaire . Ils y sont rajoutés pour rehausser le goût et pour empêcher le développement des contaminants alimentaires. Plusieurs travaux ont montré que les HE de thym, d'origan, de cannelle et d'autres plantes aromatiques ont un effet inhibiteur sur la croissance et la toxigenèse de plusieurs bactéries et champignons responsables de toxi-infections alimentaires (BEUCHAT, 1976; MADHYASTA et BHAT,1984; BERAUD, 1990; BILGRAMI *et al.*,1992).

10. Toxicité des huiles essentielles

Les H.Es ne sont pas des produits qui peuvent être utilisés sans risque. Certaines H.Es sont dangereuses lorsqu'elles sont appliquées sur la peau, en raison de leur pouvoir irritant (les huiles riches en thymol, ou en carvacrol), allergène ou photo-toxique (huiles de *Citrus*), d'autres H.Es ont un effet neurotoxique (les cétones sont toxiques pour les tissus nerveux). Toutefois, la toxicité des H.Es est assez mal connue. Il manque de données sur leurs éventuelles propriétés mutagènes et cancérigènes. La plupart du temps, sous le terme de toxicité sont décrites des données expérimentales accumulées en vue d'évaluer le risque que présente leur emploi. Il existe quelques H.Es dont certains composés sont capables d'induire la formation de cancer. C'est le cas par exemple de dérivés d'allylbenzène comme le safrole et l'estagrole. Des chercheurs ont mis en évidence l'activité hépatocarcinogénique de ces composés chez les rongeurs. Le safrole et l'estagrole, sont métabolisés au niveau du foie des rats en dérivés hydroxylés puis en esters sulfuriques électrophiles qui sont capables d'interagir avec les acides nucléiques et les protéines. Ces résultats sont controversés, car il existe des différences chez l'homme dans le processus de métabolisation de ces composés. Le safrole par exemple est métabolisé en dihydroxysafrole et trihydroxysafrole non cancérigène (GUBA, 2001).

11. Conservation des huiles essentielles

Etant par nature des composés fragiles et très volatils, les HEs doivent être stockées dans des conditions adéquates, permettant de conserver leurs propriétés chimiques ainsi que physique. Pour limiter leur volatilité, il faut prendre la précaution de les conserver dans des flacons bien étanches, hermétiquement fermés.

Les huiles essentielles sont en effet peu stables, surtout si elles sont riches en hydrocarbure insaturés. Pour diminuer leur exposition à la lumière (UV solaires) et l'oxygène

de l'air, elles doivent être conservées dans des flacons en verre ambre ou foncé, ou bien en aluminium, remplis ou conditionnés sous vide à gaz inerte, dont les bouchons sont soigneusement vissés. Leur entreposage à l'abri de la chaleur impose des températures de conservation comprises entre 4°C (réfrigération) et 30°C à 35 °C maximum (FAUCON, 2009).

La chaleur, la lumière (UV solaires) et l'O₂ de l'air favorisent l'oxydation des huiles essentielles, ce qui entraîne une dénaturation de leurs molécules actives notamment les polyinsaturées, et donc une perte réelle d'activité, un durcissement prématuré, ou des transformations en résine, donnant lieu à une multitude de produits malodorant (aldéhydes, peroxydes etc...) responsables des phénomènes d'irritation cutanées ou des muqueuses, rendant inutilisable l'HE éventée (FAUCON, 2009).

Correctement conservées, les huiles essentielles de bonne qualité pouvant être utilisées pendant cinq années au moins. La péremption est cependant plus courte pour les HEs d'agrumes (citrus) très facilement oxydable, et donc limitée à trois semaines seulement. Tandis que les autres mûrissent et se bonifient en vieillissant (SHIRNER, 2004).

Il existe des normes spécifiques sur l'emballage, le conditionnement et le stockage des huiles essentielles (norme AFNOR NF T 75-001, 1996) ainsi que sur le marquage des récipients contenant des HE (norme NF 75-002, 1996).

II. Résistance bactérienne aux antibiotiques

1. Définition de la résistance

La résistance est une adaptation des bactéries aux agents antimicrobiens. Une souche est dite résistante lorsqu'elle supporte une concentration d'antibiotique notamment plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce. La résistance bactérienne aux antibiotiques peut être naturelle ou acquise.

2. Types de résistance

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).

Des particularités structurales de la paroi cellulaire, empêchant les antibiotiques d'accéder à leur cible, ou l'absence de cible sont autant de facteurs, qui conditionnent la résistance naturelle, c'est l'exemple des bactéries du genre *Mycoplasma*. Dépourvus de cet élément constitutif, les mycoplasmes présentent une résistance intrinsèque aux β -lactames, dont le mode d'action consiste en une inhibition de la synthèse du peptidoglycane (PRESCOTT *et al.*, 2010 ; TORTORA *et al.*, 2011).

D'après TORTORA *et al.* (2011), la résistance bactérienne naturelle est permanente et d'origine chromosomique. Elle est stable, transmise à la descendance (transmission verticale), mais elle n'est généralement pas transférable d'une bactérie à l'autre (transmission horizontale). La résistance naturelle constitue un critère d'identification.

2. 2. Résistance acquise

La résistance acquise survient lorsque, seules, quelques souches d'une même espèce, normalement sensibles à un antibiotique deviennent résistantes. Cette résistance peut être acquise par mutation ou par transfert de gènes.

La résistance acquise par mutation est aussi qualifiée de résistance chromosomique. Le phénomène de mutation est conditionné par l'utilisation des antibiotiques. Ces derniers ne sont pas des agents mutagènes mais ils contribuent à sélectionner, de manière spontanée, des mutants résistants au sein d'une population bactérienne. En éliminant les bactéries sensibles, les antibiotiques permettent aux mutants résistants de se multiplier plus facilement. Le facteur principal favorisant l'évolution et l'extension des résistances aux antibiotiques est leur prescription à grande échelle en thérapeutique humaine (GOOSSENS *et al.*, 2006). Ces prescriptions sont souvent mal ciblées, comme dans les cas d'infections virales, ou incorrectement dosées (YAGUPSKY, 2006).

La transmission d'éléments génétiques mobiles, comme les plasmides et les transposons, favorise également l'acquisition des résistances par les bactéries. Elle peut s'effectuer par transduction, conjugaison ou transformation.

La dissémination des gènes de résistance peut s'effectuer au sein d'une même espèce mais aussi d'une espèce bactérienne à l'autre. Ainsi, les souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la vancomycine (SARV) auraient acquis ce caractère suite au transfert plasmidique de l'opéron *vanA*, réalisé par conjugaison avec *Enterococcus faecalis* (NOBLE *et al.*, 1992 ; ALEKSHUN et LEVY, 2007).

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'antibiotique, la modification ou le remplacement de la cible de l'antimicrobien, l'efflux actif ou encore la pénétration réduite de la molécule. D'autres mécanismes tels que la protection ou la surproduction de la cible de l'antibiotique sont également décrits. Ils sont, cependant, plus rares et surtout associés à certaines classes de composés (GUARDABASSI et COURVALIN, 2006). La figure 7 présente une illustration de ces différents mécanismes de résistance.

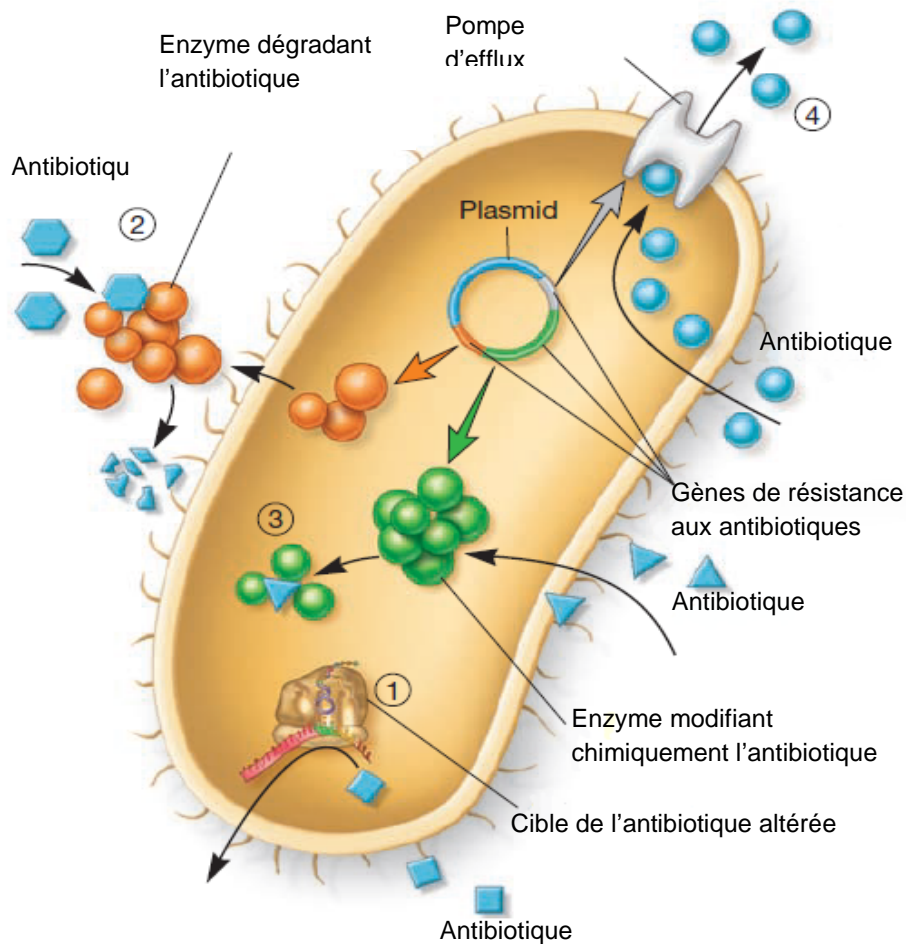


Figure 7 : Les mécanismes de résistance aux antibiotiques (WILLEY *et al.*, 2008).

3 .1. Inactivation enzymatique de l'antibiotique

L'inactivation enzymatique de l'antibiotique représente le principal mécanisme de résistance des bêta-lactames, des aminoglycosides et des phénicolés. On décrit également ce type de résistance pour le groupe MLS (macrolides, lincosamides, streptogramines), pour les tétracyclines, pour la fosfomycine et plus récemment pour les fluoroquinolones, bien que cette inactivation ne représente pas le mécanisme de résistance qui prévaut pour ces molécules. L'enzyme en modifiant le noyau actif de l'antimicrobien sur sa cible et provoque une perte d'activité. Parmi les réactions biochimiques catalysées par ces enzymes bactériennes, on peut citer des hydrolyses, des acétylations, des phosphorylations, des nucléotidylations, des estérifications, des réductions et des réactions d'addition d'un glutathion. Ces enzymes sont généralement associées à des éléments génétiques mobiles (GUARDABASSI et COURVALIN, 2006 ; ALEKSHUN et LEVY, 2007 ; NIKAIDO, 2009).

3.2. Modification ou remplacement de la cible de l'antibiotique

La cible de l'antibiotique peut être structurellement modifiée ou remplacée, de telle sorte que le composé antibactérien ne puisse plus se lier et exercer son activité au niveau de la bactérie. La modification de la cible, mécanisme de résistance décrit pour presque tous les antibiotiques, est particulièrement importante pour les résistances aux pénicillines, aux glycopeptides et aux molécules du groupe MLS chez les bactéries Gram positives, et pour les résistances aux quinolones chez les bactéries Gram positives et Gram négatives. Ce type de résistance peut être la conséquence de l'acquisition de matériel génétique mobile codant pour une enzyme modifiant la cible de l'antibiotique, ou peut résulter d'une mutation au niveau de la séquence nucléotidique de la cible. Le remplacement de la cible de l'antibiotique est, quant à lui, un mécanisme décrit pour les sulfamidés, les diaminopyrimidines (triméthoprim) et les bêta-lactames dont les *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline (SARM) ainsi qu'à toutes les bêtalactames d'usage vétérinaire sont un exemple remarquable par la synthèse d'une nouvelle PBP (Penicillin Binding Protein) possédant une affinité moindre pour la méthicilline (GUARDABASSI et COURVALIN, 2006 ; ALEKSHUN et LEVY, 2007 ; NIKAIDO, 2009).

3. 3. Pompes à efflux

Les premiers cas de résistance par efflux ont été mis en évidence pour des agents chimiothérapeutiques, efflués par la glycoprotéine P des cellules cancéreuses de mammifères (JULIANO et LING, 1976). L'efflux des antibiotiques a été observé pour la première fois avec la tétracycline à la fin des années 1970 (LEVY et MC MURRY, 1978). Les pompes d'efflux sont des transporteurs membranaires, impliqués dans la résistance aux antibiotiques par exportation active des drogues dans le milieu extracellulaire. Ces pompes peuvent être des transporteurs « drogue-spécifiques » et conférer une résistance vis-à-vis d'une seule classe d'antibiotiques. Tel est le cas des pompes Tet, qui effluent exclusivement les tétracyclines ou des pompes Mef, qui sont spécifiques des macrolides (MARKHAM et NEYFAKH, 2001). Cependant, la plupart de ces transporteurs peut prendre en charge des composés de structures très différente et contribuer ainsi, de manière significative, à la multi-résistance (MDR : multi-résistance aux drogues) des bactéries vis-à-vis des antibiotiques (POOLE, 2004). Les gènes, codant pour les pompes « drogue-spécifiques », sont souvent situés sur des éléments

génétiques mobiles (plasmides ou transposons) alors que ceux qui codent pour les pompes MDR sont, pour la plupart, chromosomiques (BUTAYE *et al.*, 2003).

Chez les bactéries Gram négatif, les systèmes d'efflux sont des complexes protéiques tripartites constitués d'une pompe transmembranaire, d'une protéine périplasmique de jonction (MFP : Membrane Fusion Protein) et d'une porine, enchâssée dans la membrane externe (OMP : Outer Membrane Protein). Les pompes les plus fréquemment rencontrées sont les pompes AcrB chez *Escherichia coli* ou MexB chez *P. aeruginosa*. Chez les bactéries Gram positif, les systèmes d'efflux ne sont constitués que de la pompe. Les plus étudiés sont les pompes NorA ou QacA, chez *S. aureus*, et PmrA chez *Streptococcus pneumoniae*.

Pour fonctionner, les pompes d'efflux utilisent l'énergie fournie par la dissipation d'un gradient de protons (familles MFS, SMR et RND) ou d'ions sodium (famille MATE) ou encore par l'hydrolyse de l'ATP (famille ABC).

3.4. Perméabilité réduite

Contrairement aux bactéries Gram positives, dont la structure enveloppante est assez simple, composée d'une paroi externe épaisse de peptidoglycanes que les antibiotiques traversent par simple diffusion, les bactéries Gram négatives jouissent quant à elles d'une enveloppe plus complexe et plus difficilement franchissable. Les figures 8a et 8b présentent la structure des bactéries Gram négatives et Gram positives.

La paroi des bactéries Gram négatif

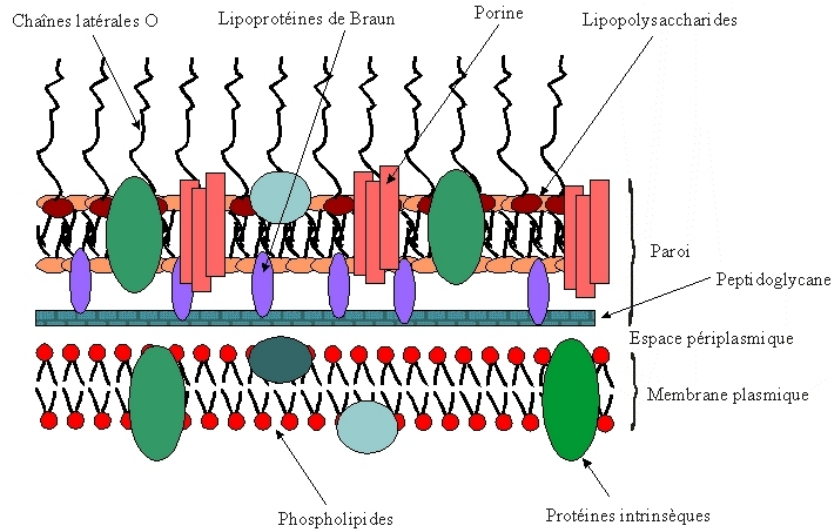


Figure 8a : Structure de la paroi des bactéries Gram négatives (HART et SHEARS, 1997).

La paroi des bactéries Gram positif

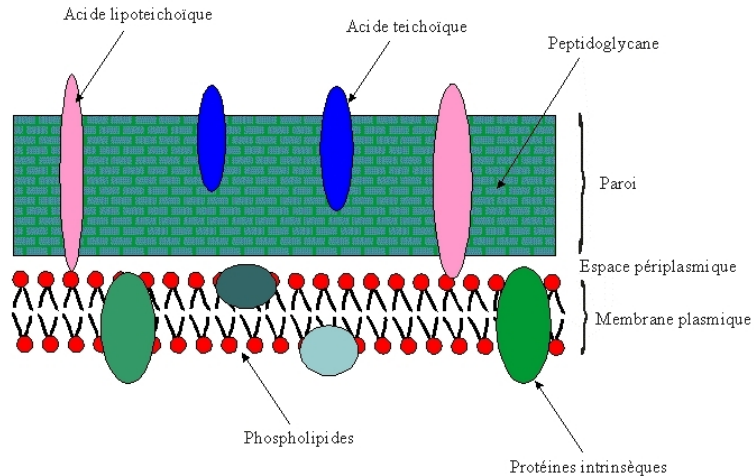


Figure 8b : Structure de la paroi des bactéries Gram positives (HART et SHEARS, 1997).

Ainsi, au sein des bactéries Gram négatives, les antibiotiques hydrophiles pénètrent dans la bactérie via des protéines transmembranaires nommées porines, alors que les molécules hydrophobes diffusent simplement à travers la couche phospholipidique. La membrane externe de certaines bactéries telles que *P. aeruginosa* est moins perméable que

celle d'autres espèces, ce qui lui confère un niveau moins élevé de sensibilité aux antimicrobiens.

En outre, des mutations au niveau des gènes qui codent pour les porines et qui conduisent à leur perte, ou à la réduction de leur taille ou encore à une diminution de leur expression, se traduiront par l'acquisition de bas niveaux de résistance vis-à-vis de nombreux antibiotiques. Citons comme exemple, la réduction de l'expression de la porine OmpF chez *E. coli* qui entraîne une réduction de sensibilité aux quinolones, aux bêta-lactames, aux tétracyclines et au chloramphénicol. La diminution de la perméabilité est donc un mécanisme de résistance cliniquement très important chez les bactéries Gram négatives et plus précisément chez *P. aeruginosa* et les *Enterobacteriaceae*, étant donné le large spectre d'antibiotiques qu'elle cible. En outre, on décrit également ce type de phénomène pour expliquer la résistance aux aminoglycosides parmi les germes anaérobies ainsi que le faible niveau de sensibilité clinique (résistance intrinsèque à bas niveau) observé vis-à-vis de cette famille de composés parmi les bactéries anaérobies facultatives telles que les entérocoques et les streptocoques. En effet, cette famille d'antibiotiques pénètre à l'intérieur des cellules bactériennes via un mécanisme de transport dépendant d'un métabolisme aérobie (GUARDABASSI et COURVALIN, 2006 ; ALEKSHUN et LEVY, 2007 ; NIKAIDO, 2009).

3.5. Protection de la cible de l'antibiotique

La protection de la cible de l'antibiotique est un mode de résistance bien connu pour la famille des tétracyclines et plus récemment décrit pour les quinolones et les fluoroquinolones. Ainsi, on ne dénombre pas moins de huit protéines de protection ribosomiale qui confèrent une résistance aux tétracyclines en les déplaçant de leur site de fixation par la création d'un encombrement stérique au niveau du ribosome. 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 resistance*) dont 5 groupes existent. Ce mécanisme a été rapporté parmi différentes bactéries Gram négatives à travers le monde, et des analogues de ces gènes ont également été décrits chez des bactéries Gram positives (RODRIGUEZ-MARTINEZ *et al.*, 2008).

3.6 . Piégeage de l'antibiotique

Les bactéries sont capables de piéger un antibiotique en augmentant la production de sa cible ou en produisant une autre molécule possédant une affinité pour ce dernier. Il en

résulte une diminution de l'antibiotique à l'état libre au niveau de la cible. Ainsi des mutations chromosomiques responsables d'une surproduction des cibles des sulfamidés et du triméthoprim ont été décrites chez de nombreuses espèces bactériennes. Ce mécanisme est également impliqué dans des bas niveaux de résistance aux glycopeptides chez certaines souches de *S. aureus*, et à la tobramycine chez *E. coli* (GUARDABASSI et COURVALIN, 2006).

4. Place des plantes dans la lutte contre la résistance

Les nouveaux composés actifs peuvent être recherchés dans les plantes médicinales, car celles-ci constituent une source potentielle de composés antimicrobiens et/ou inhibiteurs des mécanismes de résistances aux antibiotiques. En effet, de nombreux composés d'origine végétale ont déjà démontré des propriétés antimicrobiennes ; ces composés agissent suivant plusieurs mécanismes :

- Formation de complexes avec des macromolécules telles que les protéines et les polysaccharides, inhibant ainsi leurs fonctions (polyphénols) ;
- Rupture de membranes microbiennes (flavonoïdes lipophiles, terpénoïdes, défensives)
- Inhibition de l'adhésion de protéines microbiennes aux récepteurs polysaccharidiques de l'hôte (polypeptides). (MACHEIX *et al.*, 2005).

Les plantes médicinales fournissent également des composés qui n'ont pas nécessairement un effet direct sur les microorganismes, mais qui augmentent ou restaurent l'activité des antibiotiques en inhibant les mécanismes de résistance. Ces composés appartiennent à diverses classes phytochimiques et agissent comme inhibiteurs des pompes à efflux (flavonoïdes, terpénoïdes, alcaloïdes), inhibiteurs des PBP 2a (quinones, terpénoïdes) provoquant la perméabilité des membranes bactériennes (terpénoïdes) et inhibiteurs des bêta-lactamases (alkyls gallates).

III. Notions sur la nisine

1. Définition et caractéristiques de la nisine

La nisine est une bactériocine, de nature protéique produite par des bactéries, et qui présente des propriétés bactéricides ou bactériostatiques. En 1988, elle a été reconnue GRAS par la Food and Drug Administration et est utilisée en tant qu'agent de conservation (E234) dans l'industrie alimentaire. C'est un polypeptide thermostable produit par la bactérie *Lactococcus lactis ssp. Lactis*. Son spectre d'action est relativement étroit et agit essentiellement sur les bactéries Gram positif (SEBTI, 2002 ;EFSA, 2006).

2. Structure et propriétés physico-chimiques

La nisine est un peptide de 3488 Da constitué de 34 acides aminés dont la structure est représentée dans la figure 9. Les molécules de nisine peuvent s'assembler en dimères ou en oligomères de 7000 à 14000 Da (KLAENHAMMER, 1993) via des réactions intermoléculaires entre les résidus Dha et Dhb. La conformation en anneaux des lanthionines assurerait la rigidité du peptide, diminuerait sa sensibilité à la protéolyse et augmenterait sa résistance à la chaleur . MULDER *et al.* (1991) ont isolé un variant naturel de la nisine A, la nisine Z, qui diffère par un acide aminé en position 27. La spécificité de l'activité antimicrobienne des deux variants est identique. Cependant, des tests d'activité menés par la technique de diffusion en gélose et des concentrations en bactériocines supérieures à 0.1 µg/ml ont montré que la nisine A donnait des zones d'inhibition d'un diamètre inférieur à celles de la nisine Z à concentrations identiques . Cette différence s'explique par une meilleure diffusion de la nisine Z dans l'agar . La solubilité de la nisine est fonction du pH et de la force ionique de la solution (ROLLEMA *et al.*,1995). Au dessous de pH 5, la nisine A présente une solubilité supérieure à celle de la nisine Z. Dans des conditions de pH neutre ou basique, la solubilité des deux variants est comparable (ROLLEMA *et al.*,1995). Le pH influence de façon importante la stabilité de la nisine à la température (HURST, 1981 ; ROLLEMA *et al.*, 1995). La nisine dans une solution à pH 5,0 et 6 ,8 perd respectivement 40 et plus de 90 % de son activité après un autoclavage à 115,6°C, alors qu'à pH 2 aucune diminution de l'activité n'est observée (HURST, 1981).

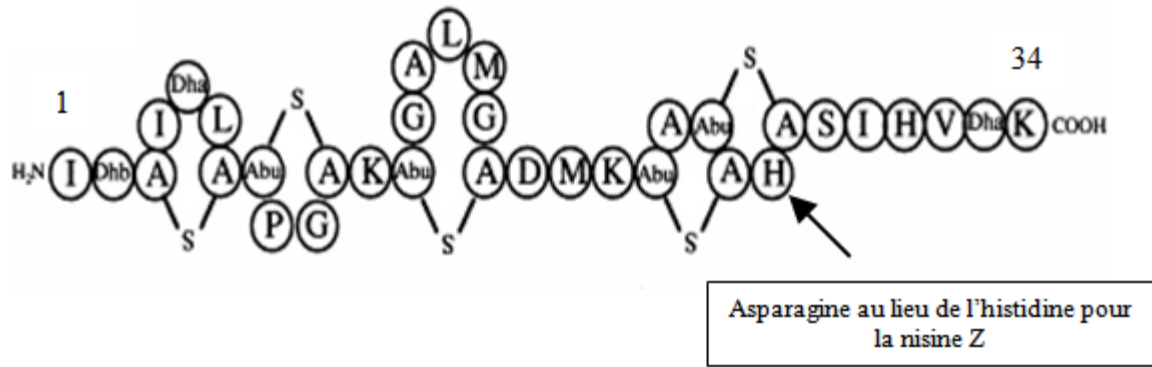


Figure 9 : Structure de la nisine A et de la nisine Z (JASNIEWSKI, 2008).

3. Mode d'action

La première cible de la nisine se situe au niveau de la membrane cytoplasmique des souches sensibles (SAHL et BIERBAUM, 1998). Des deux modèles proposés dans la littérature pour expliquer la formation des pores transmembranaires par la nisine, celui de DRIESSEN *et al.* (1995) et VAN DEN HOOVEN *et al.* (1996) est généralement retenu (SAHL *et al.*, 1998) (voir figure 10). Les forces d'attraction électrostatiques entre les charges négatives des têtes phospholipidiques de la membrane et les charges positives des résidus de lysine de l'extrémité C-terminale de la nisine seraient à l'origine des interactions entre les molécules de nisine et la membrane (BREUKINK *et al.*, 1998). Le caractère amphiphile de la nisine lui permettrait ensuite de s'insérer dans le feuillet externe de la bicouche lipidique (VAN DEN HOOVEN *et al.*, 1996). L'accumulation de plusieurs molécules de nisine au même point conduirait à la formation d'un pore. Tout en restant attachées à la surface, les molécules de nisine se déplaceraient à travers la membrane, en réponse au potentiel électrique, entraînant avec elles les lipides de la couche externe du côté cytoplasmique (MOLL et KONINGS, 1996). La formation transitoire de ces pores s'accompagne d'une rupture de la force proton- motrice par dissipation du potentiel électrique transmembranaire ($\Delta\psi$ et du gradient de pH conduisant à l'arrêt de toutes biosynthèses (MONTVILLE et BRUNO, 1994). Les pores entraînent également le passage dans le milieu extracellulaire d'ATP, d'acides aminés, de potassium et de phosphate inorganique (RUHR et SAHL, 1985 ; ABEE, 1995).

Le deuxième mode d'action de la nisine est l'inhibition de la biosynthèse de la paroi cellulaire (REISINGER *et al.*, 1980). Cette inhibition résulterait de la formation d'un complexe entre le précurseur lipidique membranaire du peptidoglycane, le lipide II, et les

molécules de nisine. Le lipide II est également la seule cible spécifique de la nisine pour la formation de pores. Cette association engendre des pores stables et uniformes composés de 8 molécules de nisine et 4 de lipides II selon un nouveau modèle proposé par (HASPER *et al.*, 2004).

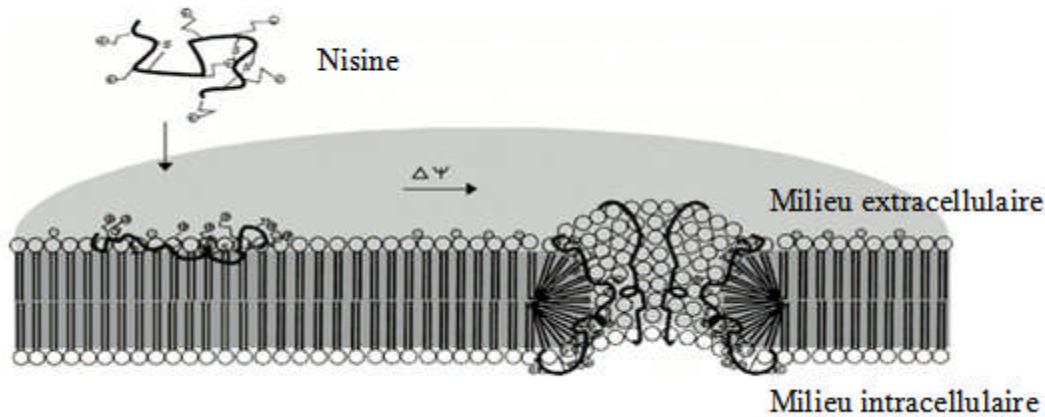


Figure 10 : Modèle de formation d'un pore transmembranaire par la nisine (SAHL *et al.*, 1998).

4. Toxicité de la nisine

Les bactériocines sont dégradées par certaines enzymes protéolytiques. La non-toxicité de la nisine, la seule bactériocine autorisée comme additif alimentaire, a été démontrée (TUNELI et DELVES-BROUGHTON, 1998). De plus, un facteur important à considérer est que la nisine présente dans les aliments, est facilement dégradée par les enzymes digestifs sans toutefois générer des produits toxiques (HURST, 1981). Ainsi, l'organisation de l'agriculture et de l'alimentation (FAO) et l'organisation mondiale de la santé (OMS) ont recommandé une prise moyenne journalière (Average Daily Intake: ADI) de 0 à 33 mg de nisine par kg de poids corporel. La nisine a été approuvée pour des utilisations spécifiques dans différents produits alimentaires dans 50 pays dont les Etats-Unis (DELVES-BROUGHTON, 1997 ; TUNELI et DELVES BROUGHTON, 1998). Toutefois son usage alimentaire reste restreint à certains aliments (BOUKSAIM *et al.*, 1999).

5. Intérêts de la nisine

La nisine joue un rôle dans la conservation des aliments, elle est la seule bactériocine des BL acceptée comme bio-ingrédient dans les aliments par FDA (1988). Elle est surtout réputée pour son efficacité contre les spores de *Clostridium* et de *Bacillus*, fréquemment responsables de la détérioration des conserves alimentaires (DELVES-BROUGHTON, 1990).

WAJID et KALN, (1976) ont montré que des échantillons du lait stérilisés et traités avec la nisine ont pu être conservés six mois à 37°C et trois semaines à 55°C.

La nisine connaît une large application comme additif alimentaire dans les conserves de végétaux, soupes ou poudings à base de céréales (ECKNER, 1992).

TAYLOR *et al.* (1990) ont rapporté qu'un emballage sous atmosphère modifiée (CO₂) ou sous vide combiné à l'utilisation de la nisine pourrait allonger significativement la durée de vie de certains poissons.

L'ajout de bactériocines dans les aliments permettrait non seulement de commercialiser des produits plus sains et plus sécuritaires mais aussi de diminuer l'emploi de conservateurs chimiques (HARLANDER, 1993).

Aussi, la nisine a fait l'objet d'un brevet quant à son utilisation dans la prévention et le traitement d'ulcère causé par *Helicobacter pylori*. Elle est, de plus, connue pour être un agent thérapeutique potentiel des mastites bovines, et est déjà utilisée comme agent prophylactique. Différentes études ont été réalisées sur l'utilisation de la nisine en solution buccale. Elle a démontré une action préventive contre la plaque dentaire et les inflammations gingivales chez le chien (HOWELL *et al.*, 1993).

IV. Description des plantes étudiées

1. *Pinus sylvestris*

1.1. classification

Regne	:Plantae
Sous-Regne	:Tracheobionta
Division	:Coniferophyta
Classe	:Pinopsida
Ordre	:Pinales
Famille	:Pinaceae
Genre	: <i>Pinus</i>
Especie	: <i>Pinus sylvestris</i>



Figure 11: Photographie de *Pinus sylvestris*

1. 2. Description botanique

Le pin sylvestre (*Pinus sylvestris*), porte plusieurs noms, comme « pin d’Auvergne », « pin de Genève », « pin rouge » ou encore « pin d’Écosse ».

Le Pin sylvestre est un arbre des régions montagneuses, poussant à basse altitude. Il se reconnaît à son écorce rouge. Il peut atteindre 30 mètres de hauteur et entre 6 à 10 mètres d'étalement. Il peut devenir centenaire.

Le feuillage est composé d'aiguilles persistantes, doubles dans une gaine. Elles sont vrillées et de couleur vert bleuté. Elles ont de 5 à 7 cm de longueur. L'ombre n'est pas trop épaisse.

L'écorce est formée de fines écailles, de couleur brun-rouge. Elle vire à la couleur saumon sur les branches et en haut du tronc sur les vieux arbres.

Les fleurs mâles apparaissent en Mai-Juin ; elles forment de petits chatons jaunes qui sont groupés à la base des pousses. Les fleurs femelles sont de couleur pourpre, de petite taille et ont une position terminale (CARON,2001).

1. 3. Huile essentielle de *Pinus sylvestris*

L'huile essentielle est extraite des aiguilles fraîches, par distillation complète par entraînement à la vapeur d'eau.

Le profil chromatographique indiqué par la pharmacopée Européenne est :

- Monoterpènes : α -pinène (32-60%), β -pinène (22%), δ -3-carène, limonène, β -myrcène
- Esters terpéniques : acétate de bornyle
- Sesquiterpènes : β -caryophyllène (BRUNETON, 2009).

Pinus sylvestris possède de nombreuses propriétés anti-inflammatoires, a une place dans le traitement de la sciatique, du lumbago, de l'arthrite et notamment de la polyarthrite rhumatoïde.

Les huiles essentielles de pin sylvestre sont utilisées comme complément dans le parfumage des savons, pour la préparation des produits de bain, pour les désodorisants, les produits de vaporisation et d'inhalation (MAXIA *et al.*, 2001).

2. *Pelargonium asperum*

2. 1. Classification

Règne	: Plantae
Division	: Magnoliophyta
Classe	: Magnoliopsida
Ordre	: Geraniales
Famille	: Geraniaceae
Genre	: <i>Pelargonium</i>
Espèce	: <i>Pelargonium asperum</i>



Figure 12: Photographie de *Pelargonium asperum*

2. 2. Description botanique

Pelargonium asperum est une plante buissonnante de 60 cm et parfois plus. Les tiges poussent vertes et se lignifient avec l'âge. Il porte des feuilles cordiformes avec 5 à 7 lobes, opposées, recouvertes de poils qui donnent un aspect velouté. Les poils défensifs rendent la plante poisseuse, les poils glanduleux sont remplis d'essence aromatique et rendent la plante odorante quand on la touche. Ils ont un rôle dans la défense contre les insectes, les pucerons par exemple. Lorsqu'on froisse la feuille, elle dégage un puissant parfum de rose citronné.

La racine est pivotante. Les fleurs montrent 5 pétales roses, dont certains se chevauchent et parmi lesquels 2 sont lignés de rouge. Elles sont en grappe et groupées par 2, et apparaissent en continue toute la belle saison. Des 2 ovaires présents, un seul est fécondé, et produit un fruit allongé et étroit (ANONYME1).

2. 3. Huile essentielles de *Pelargonium asperum*

La composition biochimique est susceptible d'évoluer en fonction des conditions de production.

- Composés chimiques principaux : Monoterpénols 50% (Citronnellole 21,22%, géraniol 13,42, linalol 15,36), Esters (25%) (Formiate de citronnelyle et de géranyle)
- Autres composés chimiques : Sesquiterpènes, Cétones (5 à 10 %) (Isomenthone et menthone), Oxydes.

Propriétés particulières de l'huile essentielle de *Pelargonium asperum*: Hémostatique, Cicatrisante, Antispasmodique, Anti-inflammatoire, Anti-infectieuse, Anti-fongique de la peau.

Autres propriétés : stimulante lymphatique, stimulante hépatique et pancréatique, relaxante (BOUKHATEM *et al.*,2010).

I. Matériel et méthodes

1. Matériel

1.1. Microorganismes testés

Le choix des bactéries s'est porté sur six souches fréquentes en pathologie humaine. Nous avons sélectionné deux groupes de bactéries, des bactéries à Gram positif et des bactéries à Gram négatif (Voir tableau 1).

Tableau 1 : Tableau descriptif des différentes bactéries utilisées dans cette étude

Les souches bactériennes	Type de Gram	Provenance
<i>Escherichia coli</i> (ATCC25922)	Gram négatif	Laboratoire de microbiologie de l'UMMTO
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC43300)	Gram positif	
<i>Escherichia coli</i>	Gram négatif	Laboratoire de microbiologie du CHU de Tizi-Ouzou
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram positif	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Gram négatif	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gram négatif	

1.2. Milieux de culture

- Gélose nutritive, gélose de Mueller Hinton ;
- Milieux liquides : BrainHeart Infusion Broth (BHIB)

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

1.3. Antibiotiques utilisés

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

- Amoxicilline (AM) de 25 µg/disque ;
- Oxytétracycline (O) de 30 µg/disque ;
- Gentamicine (GN) de 10 µg/disque.

1. 4. La Nisine

La nisine de type A fournie par Mr Ouelhadj.

1. 5. 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 2 : Tableau descriptif des deux huiles essentielles utilisées dans cette étude

Huiles essentielles	Nom latin	provenance	contrôle
Pin sylvestre	<i>Pinus sylvestris</i>	Laboratoires Pierre Fabre, France	Ecocert Greenlife F32600
Géranium	<i>Pelargonium asperum</i>	Laboratoires Puresentiel, Belgique	Ecocert France Fr-BIO-01

1 .6. Appareillage

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

2. Méthodes

2.1. Tests de confirmation des souches bactériennes

2 .1 .1 . Tests microbiologiques

Chacune des souches a été d'abord revivifiée dans un milieu BHIB, puis repiquée sur un milieu sélectif afin d'obtenir des souches jeunes de 24h. Après incubation à 37°C pendant 24h, la coloration de Gram et l'examen microscopique au grossissement x1000 ont été

réalisés. Ils permettent l'observation du mode de regroupement, la forme des cellules bactériennes ainsi que le type de Gram.

La coloration de Gram a été réalisée selon la méthode décrite par DELARRAS (2007)

- Préparer un frottis de la souche test ;
- Recouvrir le frottis de violet de gentiane, laisser agir 1 minute puis rincer à l'eau distillée ;
- Verser du lugol et laisser agir pendant 1 minute, rincer à l'eau distillée ;
- Décolorer à l'alcool à 95°, entre 15 et 30 secondes, rincer à l'eau distillée ;
- Recolorer avec de la fuchsine pendant 10 à 30 secondes, rincer à l'eau distillée ;
- Sécher au-dessus de la flamme d'un bec bunsen ;
- Observation au microscope optique à l'objectif x 100 à l'immersion.

Les bactéries colorées en violet sont des bactéries à Gram positif, et celles colorées en rose sont des bactéries à Gram négatif.

2.2. Préparation de l'inoculum

2.2.1. Préparation de pré-culture

Les tests antibactériens doivent être réalisés à partir de cultures jeunes de 18 à 24h, en phase exponentielle de croissance. Un repiquage est réalisé à partir du bouillon BHIB dans des boîtes de Pétri contenant le milieu Muller Hinton Agar (MHA), puis incubées pendant 24h à 37°C.

2.2.2. Préparation de la suspension bactérienne

A partir des boîtes de Pétriensemencées, on a prélevé quelques colonies dans 15ml d'eau physiologique stérile. La suspension bactérienne a été standardisée à une DO de 0,08-0,1 à l'aide d'un spectrophotomètre à 620 nm, qui correspond à 10^7 UFC/ml, puis on a réalisé une dilution de 1/10 pour avoir une concentration bactérienne de 10^6 UFC/ml.

2. 3. Etude de l'activité antibactérienne

2.3.1. Test de sensibilité des souches bactériennes aux huiles essentielles

L'aromatogramme consiste à estimer l'inhibition de la croissance des germes testés soumis au contact des huiles essentielles étudiées (*Pinus sylvestris* et *Pelargonium asperum*). Cette méthode a été réalisée sur milieu gélosé de Mueller Hinton (MHA). 0,1ml de chaque suspension bactérienne standardisée à 10^6 UFC/ml est ensemencé par écouvillonnage dans les boîtes de Pétri. Des disques de papier Wattman stériles de 6 mm de diamètre imprégnés de 10 μ l d'H.E à tester ont été déposés au centre de chaque boîte. On raison de l'hydrophobicité des H.E et pour avoir une meilleure diffusion de ces huiles dans le milieu, un émulsifiant Diméthyle Sulfoxyde (DMSO) est additionné aux H.E à raison de (5% V/V)(DJENANE *et al.*, 2011).

Un témoin négatif a été réalisé par un dépôt de 10 μ l de DMSO sur des disques entreposés sur un milieu préalablement ensemencé de la bactérie teste.

Un témoin positif a été réalisé par un dépôt d'un disque de chacun des trois antibiotiques sur un milieu préalablement ensemencé de la bactérie teste.

Chaque essaie est répété trois fois.

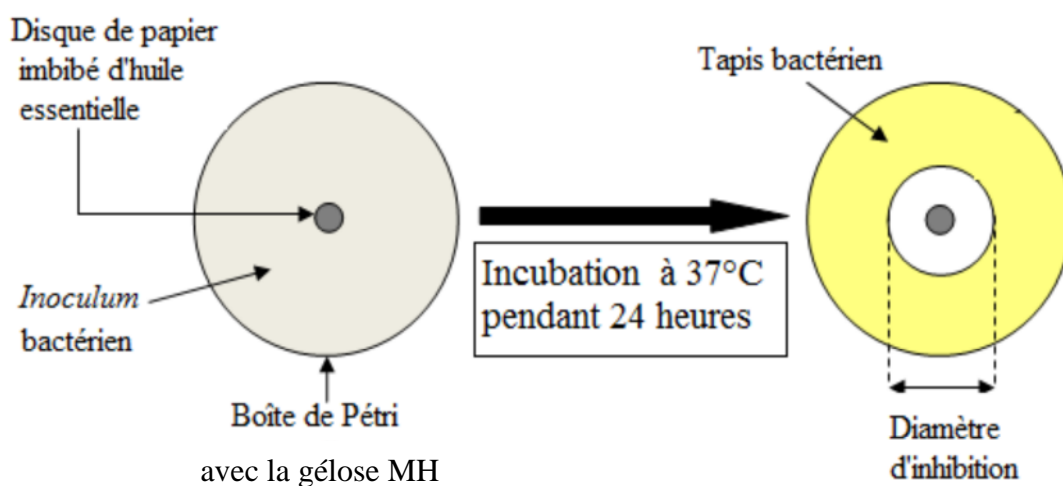


Figure 13 : Illustration de la méthode d'aromatogramme (ZAIKI, 1988).

La lecture a été effectuée par mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'une règle en (mm). Selon PONCE *et al.* (2003), la sensibilité des souches vis-à-vis des H.Es est déterminée comme suit :

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

2.3.2. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

Cette technique consiste à inoculer à l'aide d'un inoculum standardisé, une gamme de concentration décroissante en H.E. Après incubation, l'observation de la gamme permet d'accéder à la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI), qui correspond à la plus faible concentration en H.E capable d'inhiber la croissance bactérienne. La CMI des H.Es étudiées a été déterminée suivant la technique de macrodilution en milieu liquide rapportée par GUINOISEAU (2010).

2.3.2.1. Technique de macrodilution en milieu liquide

450 µl de l'H.E à tester supplémentée en DMSO (5% V/V), sont placés dans un tube stérile contenant 3,55 ml du Bouillon Muller Hinton (MHB). Une dilution de demi en demi est réalisée dans du milieu MHB, de manière à obtenir une gamme de concentration comprise entre 63,38 et 0,12 µl/ml, les valeurs de dilution sont résumées dans le tableau 3.

Tableau 3: Valeurs des dilutions utilisées pour déterminer les CMI

Rapport de dilution del'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	15,84	7,92	3,96	1,98	0,99	0,49	0,24	0,12

10,5 µl d'un inoculum bactérien de 10^6 UFC/ml sont déposés dans chacun des tubes de la gamme de dilution. Un témoin de la croissance bactérienne, pour lequel 10,5 µl de la suspension bactérienne standardisée ont été déposés dans du milieu MHB supplémenté en DMSO (5% V/V), est également réalisé. Chaque essai est répété 2 fois.

Incubation 24h à 37°C, puis l'observation de la présence ou absence de croissance bactérienne à l'œil nu.

Selon OUSSOU *et al.* (2004), le contenu de tous les tubes où il n'y a pas eu de croissance visible est ensemencé sur un milieu gélosé. Un témoin négatif est réalisé à partir du tube témoin (ne contenant pas d'huile). Incuber à 37°C pendant 24h. L'absence du développement microbien implique l'effet bactéricide, alors que la présence de colonies (croissance bactérienne) est l'effet bactériostatique. Chaque essai est répété 2 fois.

2. 4. Etude de l'activité antibactérienne de la nisine

L'activité de la nisine a été mise en évidence par la méthode de l'antibiogramme. Etant donné que l'activité de la nisine dépend du pH (diminue lorsque le pH augmente), une autre solution a été préparée à base de nisine dissoute dans du HCL à 0,02 N de façon à obtenir la concentration de 1,5 mg/ml. Un contrôle négatif a été réalisé en imbibant des disques de 10 µl du HCL à 0,02 N puis, les entreposer sur les milieux de cultures ensemencés. Chaque essai est répété trois fois.

Ces concentrations ont été choisies en se référant à celle utilisées par BANI-JABER (2000). L'ajout d'HCL à 0,02 N pour la préparation de la nisine a été choisi en se référant à la méthode établie par KHADDOR (2003).

2.5. Etude de l'effet de la combinaison des huiles essentielles avec la nisine

Par la méthode de diffusion sur milieu gélosé ; dans le but de la mise en valeur d'un éventuel effet synergique entre les H.Es et de la nisine, des combinaisons entre les H.Es émulsifiées dans du DMSO à (5% V/V) et la nisine dissoute dans du HCL à 0,02N à une concentration de 1,5 mg/ml ont été effectuées avec trois concentrations différentes :

50% d'H.E + 50% de nisine ;

25% d'H.E + 75% de nisine ;

75% d'H.E + 25% de nisine .

Les disques imbibés de 10 µl de la solution préparée initialement, par mélange des différentes concentrations, sont déposés sur les boîtes de pétri préalablementensemencées. Les résultats obtenus seront comparés aux résultats de la nisine et des huiles essentielles séparément.

Des témoins négatifs ont été réalisés, par mélange de 50% de DMSO et de 50% d'HCL à 0,02N. Chaque essai est répété trois fois.

D'après PIBIRI (2005), il existe quatre effets antimicrobiens des associations d'huiles essentielles, ainsi pour les antibiotiques :

Indifférent : l'activité d'une huile essentielle n'est pas affectée par l'autre :

(A+B)= Effet A ou Effet B.

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

(A+B)=Effet A + Effet B.

Synergie : l'effet est significativement supérieur à la somme de chaque huile essentielle étudiée isolément, à la même concentration :

(A +B) > Effet A + Effet B.

Antagonisme : l'association diminue l'activité de l'une ou l'autre des huiles essentielles. Elle est inférieure à la somme des effets de chaque H.E prise séparément :

(A +B) < Effet A ou Effet B.

2. 6. Analyses statistiques

Les analyses de la variance ont été réalisées par le logiciel statistique Statistica version 7.1. Toutes les expériences ont été réalisées en triple, les résultats ont été représentés par la moyenne avec son écart type pour chaque cas. Les différences ont été considérées significatives à $p \leq 0,05$.

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

1. Résultats des tests de vérification des souches bactériennes

Les caractères morphologiques des bactéries testées sont résumés dans le tableau suivant.

Tableau 4 : Caractères morphologiques étudiés pour la vérification des souches bactériennes

Espèce bactérienne	Milieu de culture	Gram	Aspect microscopique
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Gélose Hecktoen	Négatif	Coccobacille
<i>E. coli</i>	Gélose Hecktoen	Négatif	Coccobacille
<i>P. aeruginosa</i>	Gélose nutritive King A et King B	Négatif	Bacille
<i>K. pneumoniae</i>	Gélose Hecktoen	Négatif	Coccobacille
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Gélose Chapman	Positif	Cocci en grappe de raisin
<i>S. aureus</i>	Gélose Chapman	Positif	Cocci en grappe de raisin

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

2.1. Résultats des témoins négatifs réalisés avec le DMSO

La figure 14 montre les témoins négatifs réalisés avec le DMSO par la méthode de diffusion sur gélose.

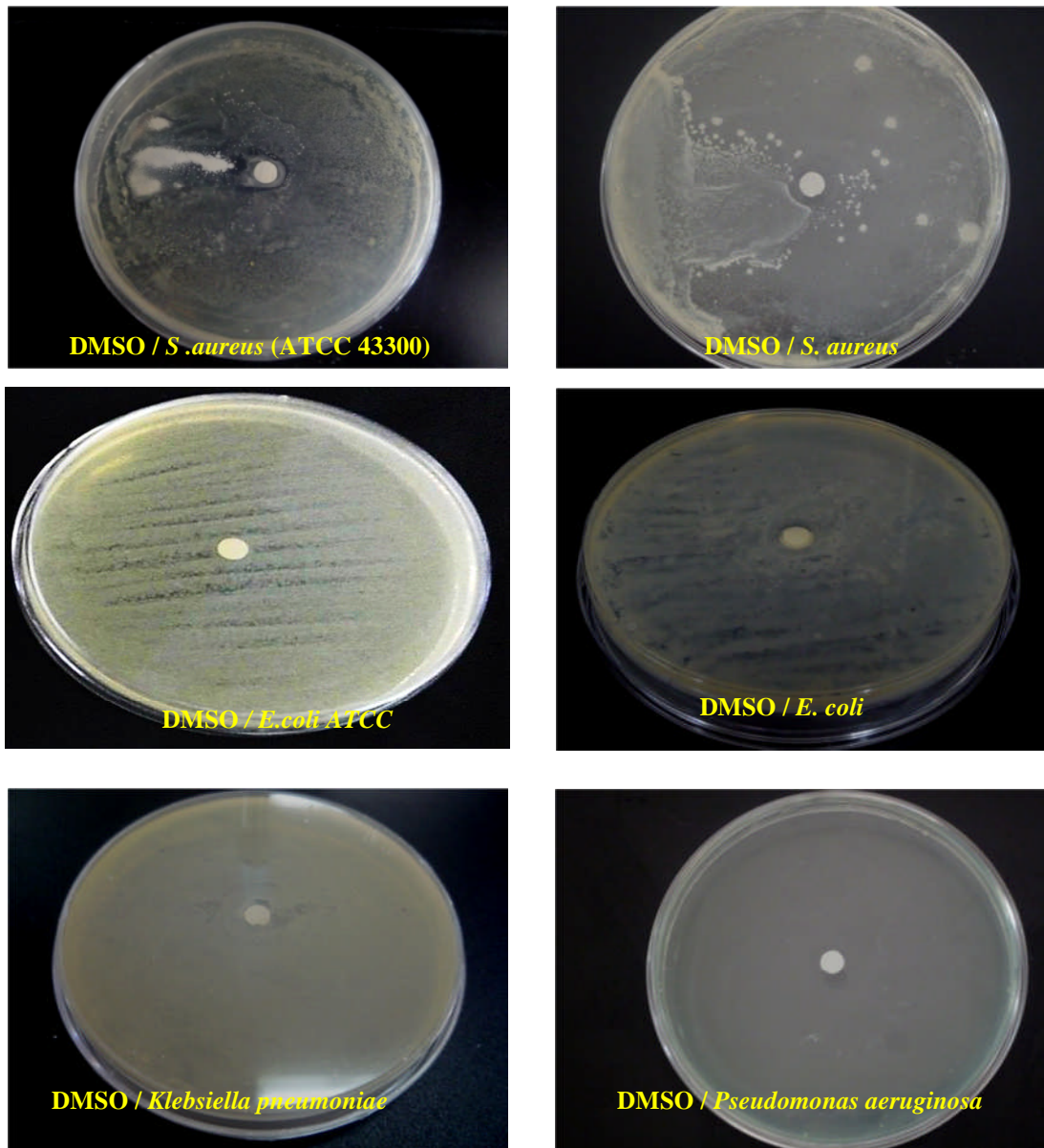


Figure 14: Témoins négatifs réalisés avec le DMSO sur les six bactéries testées

2.2. Résultats des témoins positifs (antibiogramme)

L'antibiogramme consiste à rechercher la sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques. Nous avons testé l'activité de trois antibiotiques choisis selon leur fréquence d'utilisation en milieu hospitalier, par la méthode standard des disques.

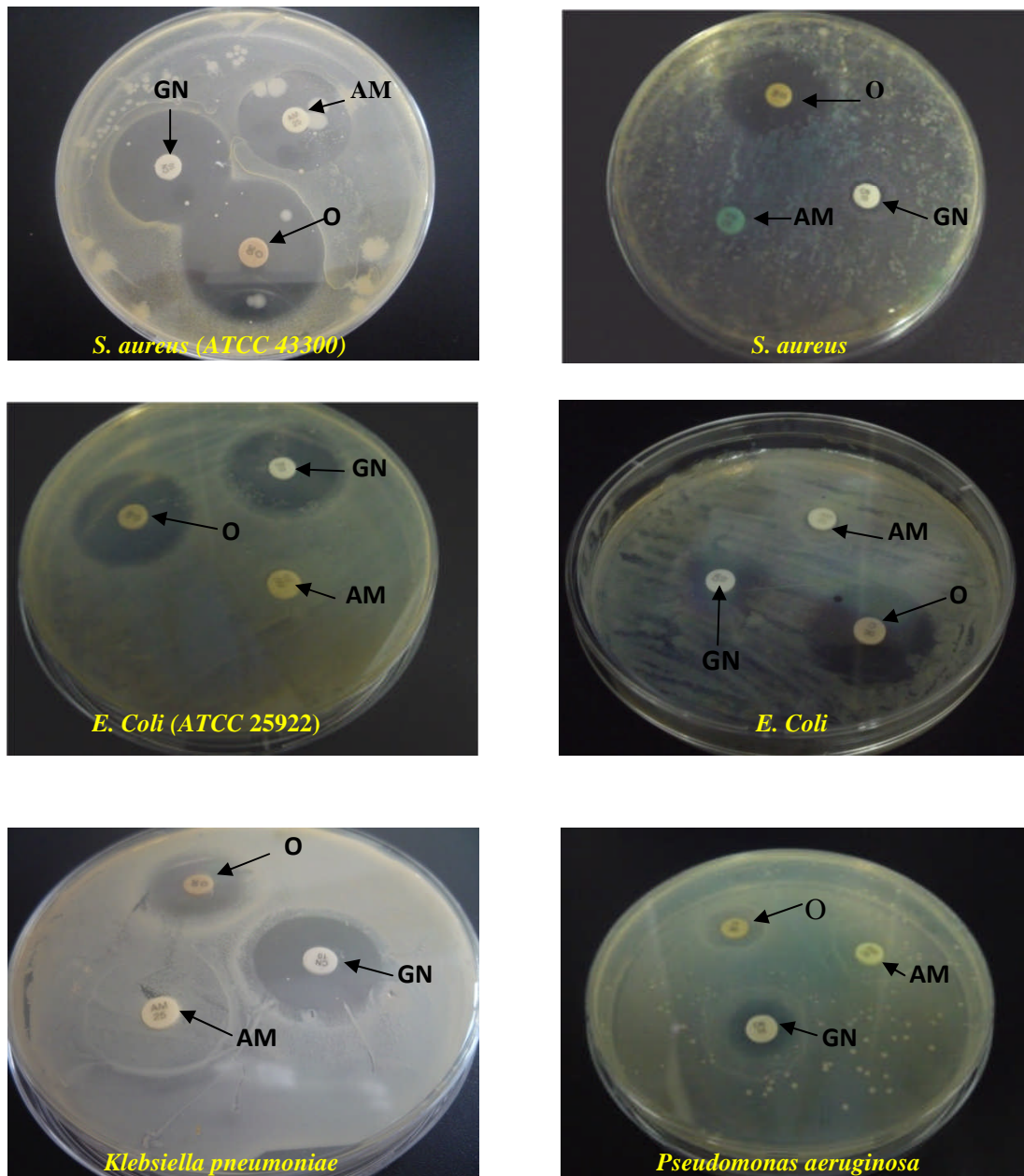


Figure 15: Témoins positifs réalisés avec les antibiotiques Amoxicilline (AM, 25 µg), Gentamicine (GN, 10 µg) et Oxytétracycline (O, 30 µg) sur les six souches bactériennes testées.

Le tableau suivant montre les diamètres d'inhibition ainsi que la sensibilité des souches bactériennes aux trois antibiotiques (Amoxicilline, Gentamicine et Oxytétracycline).

Tableau 5 : Résultats des diamètres d'inhibition en mm (moyenne \pm l'écart type) des antibiotiques sur les six souches bactériennes.

Souches \ ATB	Diamètres d'inhibition en (mm) et en moyenne des trois essais \pm l'écart type		
	Amoxicilline	Gentamicine	Oxytétracycline
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC43300)	26 \pm 0,00	28 \pm 0,00	30,00 \pm 0,00
<i>Staphylococcus aureus</i>	6,00 \pm 0,00	6,00 \pm 0,00	22,5 \pm 3,53
<i>Escherichia coli</i> (ATCC25922)	6,00 \pm 0,00	24,50 \pm 0,70	23,5 \pm 0,70
<i>Escherichia coli</i>	6,00 \pm 0,00	19 \pm 1,41	24,00 \pm 0,00
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6,00 \pm 0,00	28,50 \pm 2,12	20,50 \pm 0,70
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6,00 \pm 0,00	14,50 \pm 0,70	15,50 \pm 0,70

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

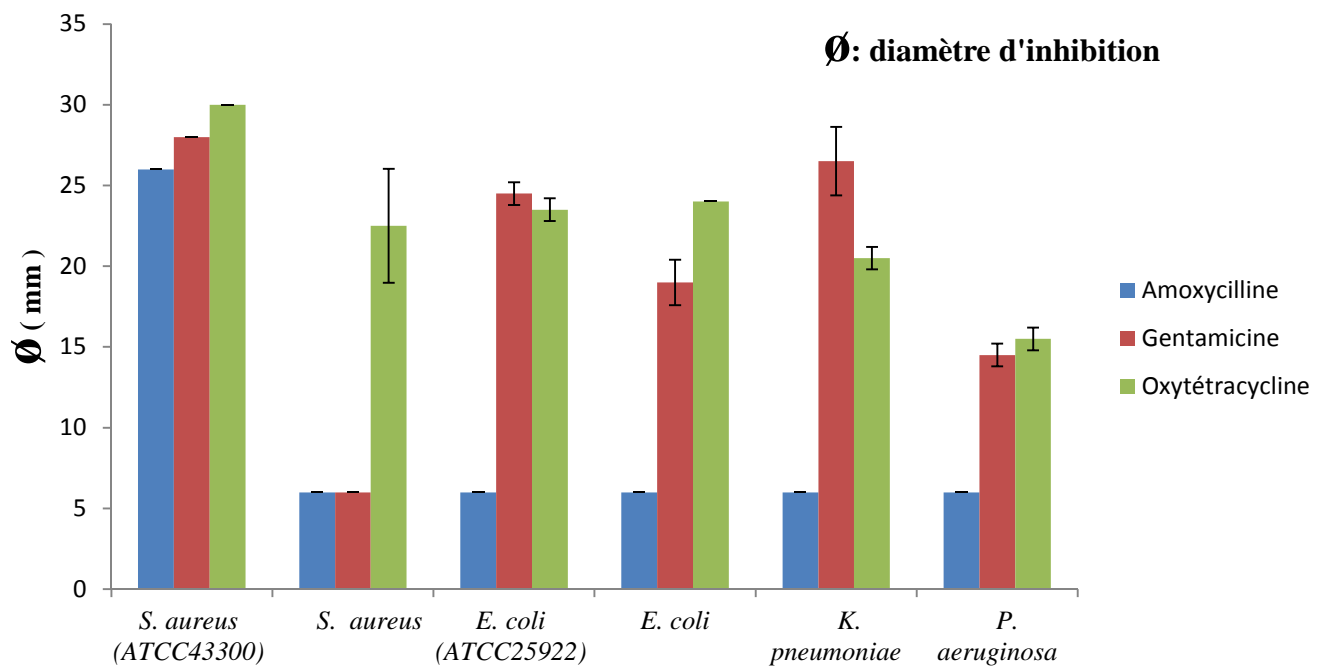


Figure 16 : Représentation graphique du test de sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis des trois antibiotiques.

D'après l'histogramme représenté dans la figure 16 , on constate que les bactéries testées présentent des sensibilités différentes vis-à-vis des antibiotiques utilisés. Pour l'Amoxicilline, *Staphylococcus aureus* (ATCC43300) est la seule bactérie sensible alors que pour Gentamicine et Oxytétracycline toutes les bactéries se sont montrées sensibles à l'exception de *Staphylococcus aureus* qui est résistante à Gentamicine.

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

3.1. Résultats du test de sensibilité des souches bactériennes à l'HE de *Pinus sylvestris*

La figure 17 montre l'effet de l'HE de *Pinus sylvestris* vis-à-vis des six souches bactériennes étudiées.

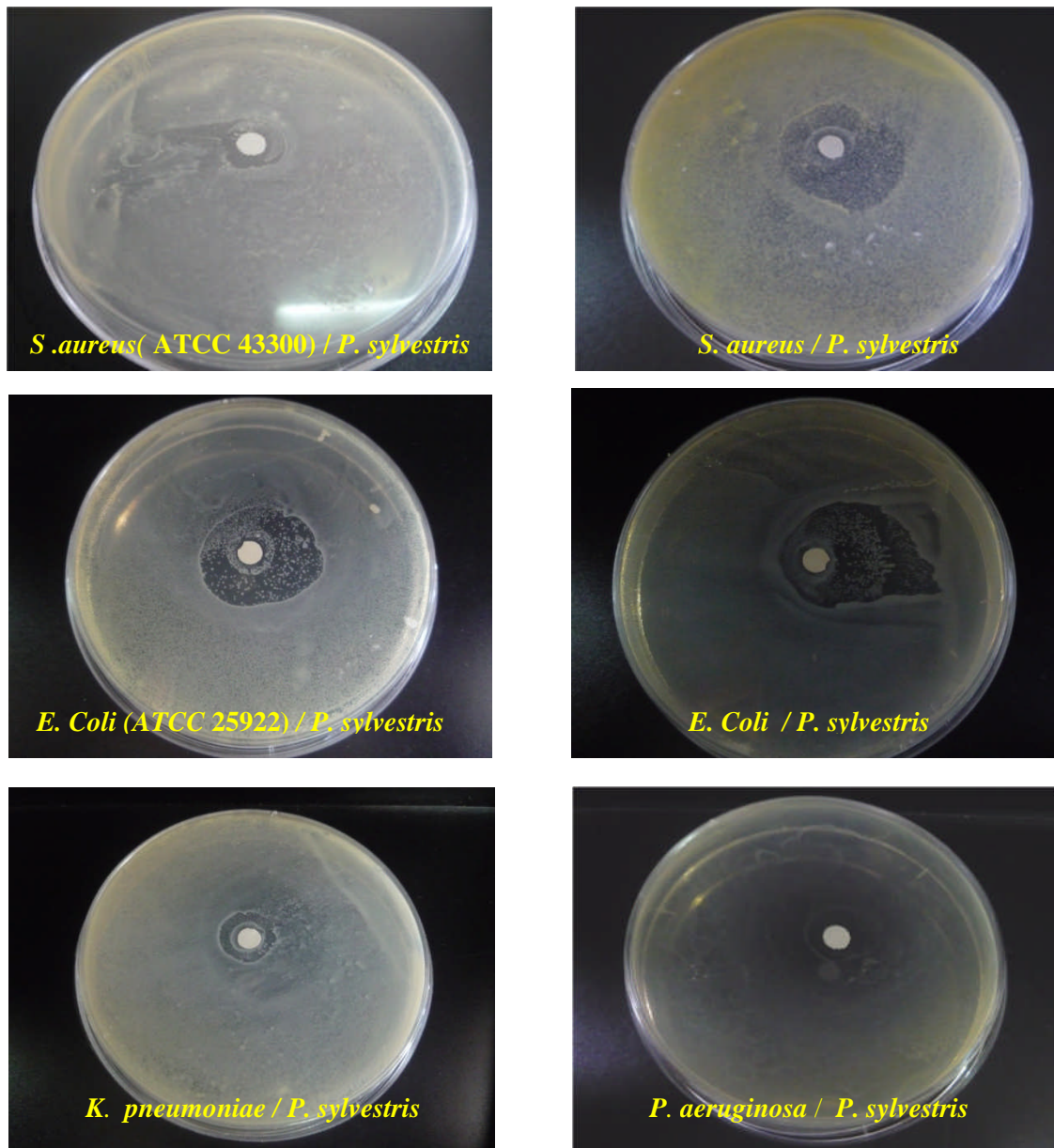


Figure 17 : Effet de l'huile essentielle de *Pinus sylvestris* sur les six souches bactériennes testées.

Le tableau suivant montre les diamètres d'inhibition ainsi que la sensibilité des souches bactériennes à l'huile essentielle de *Pinus sylvestris*.

Tableau 6 : Résultats des diamètres d'inhibition en mm (moyenne \pm l'écart type) de l'H.E de *Pinus sylvestris* les six souches bactériennes testées.

Souches		<i>Pinus sylvestris</i>	
		Diamètres d'inhibition en (mm) et en moyenne des trois essais \pm l'écart type	Sensibilité
Gram (+)	<i>S. aureus</i> (ATCC43300)	13,50 \pm 0,70	(+)
	<i>S. aureus</i>	29,50 \pm 2,12	(+++)
Gram(-)	<i>E. coli</i> (ATCC25922)	28,50 \pm 0,70	(+++)
	<i>E. coli</i>	32,00 \pm 1,41	(+++)
	<i>K. pneumoniae</i>	13,00 \pm 0,00	(+)
	<i>P. aeruginosa</i>	6,00 \pm 0,00	(-)

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

3.2. Résultats du test de sensibilité des souches bactériennes à l'H.E de *Pelargonium asperum*

La figure suivante montre l'effet de l'HE de *Pelargonium asperum* vis-à-vis des six souches bactériennes étudiées.

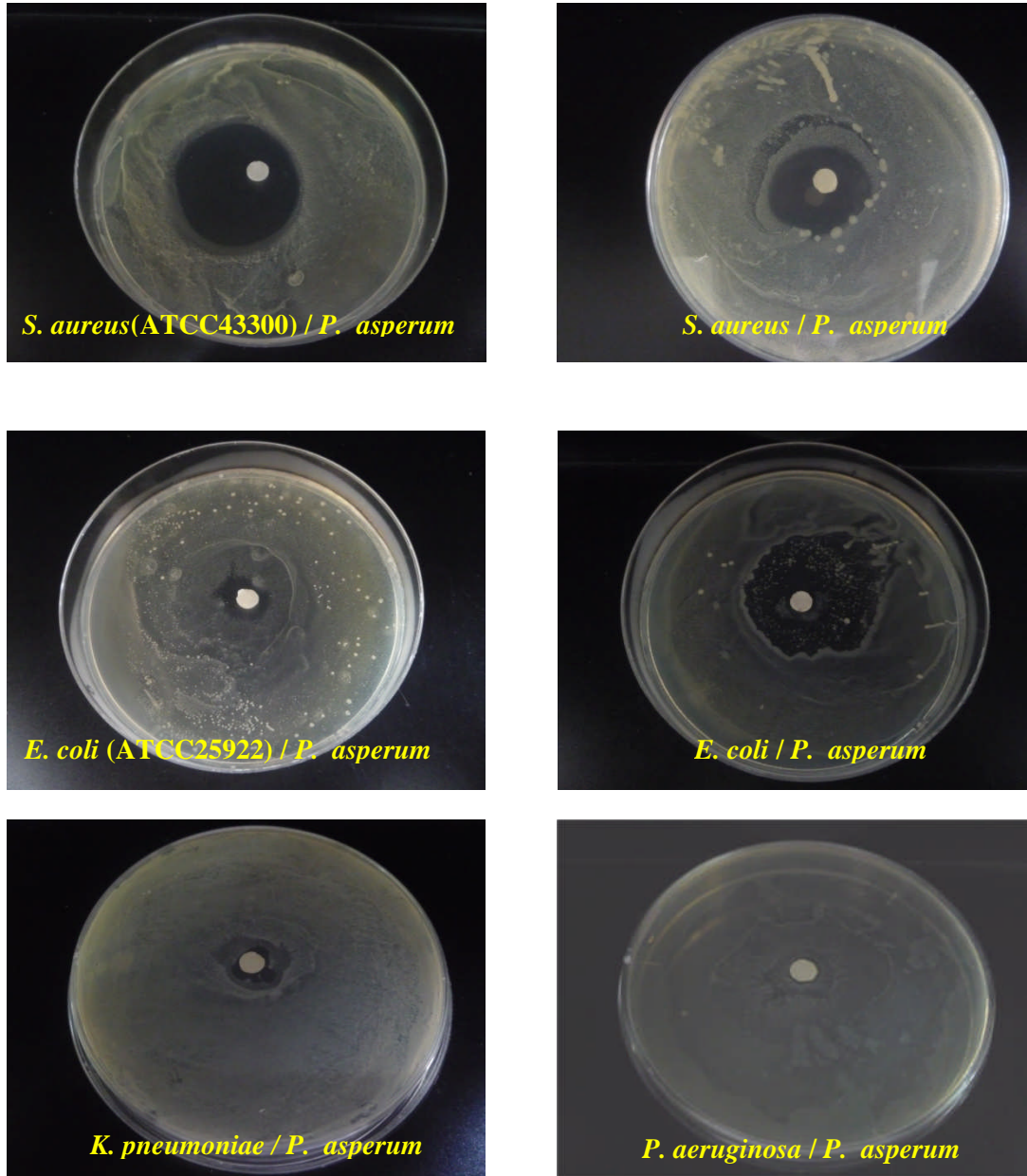


Figure 18 : Effet de l'huile essentielle de *Pelargonium asperum* sur les six souches bactériennes testées.

Le tableau 7 montre les diamètres d'inhibition ainsi que la sensibilité des souches bactériennes à l'huile essentielle de *Pelargonium asperum*.

Tableau 7 : Résultats des diamètres d'inhibition en mm (moyenne \pm l'écart type) de l'H.E de *Pelargonium asperum* les six souches bactériennes testées.

Souches		<i>Pelargonium asperum</i>	
		Diamètres d'inhibition en (mm) et en moyenne des trois essais \pm l'écart type	Sensibilité
Gram (+)	<i>S. aureus</i> (ATCC43300)	36,00 \pm 1,41	(+++)
	<i>S. aureus</i>	22,50 \pm 3,53	(+++)
Gram(-)	<i>E. coli</i> (ATCC25922)	12,50 \pm 3,53	(+)
	<i>E. coli</i>	40,00 \pm 7,07	(+++)
	<i>K. pneumoniae</i>	12,00 \pm 0,00	(+)
	<i>P. aeruginosa</i>	10,50 \pm 0,70	(+)

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

Le tableau suivant résume les résultats du test d'aromatogramme obtenus avec les deux huiles essentielles initialement émulsifiées dans du DMSO à raison de 5 % (V/V) vis-à-vis des souches bactériennes testées.

Tableau 8 : Tableau récapitulatif des résultats du test de sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis des deux huiles essentielles testées.

Souche	Diamètres d'inhibition en (mm) et en moyenne des trois essais \pm l'écart type			
	<i>Pinus sylvestris</i>		<i>Pelargonium asperum</i>	
	Diamètre	Sensibilité	Diamètre	Sensibilité
<i>S.aureus</i> (ATCC43300)	13,50 \pm 0,70	(+)	36,00 \pm 1,41	(+++)
<i>S.aureus</i>	29,50 \pm 2,12	(+++)	22,50 \pm 3,53	(+++)
<i>E.coli</i> (ATCC25922)	28,50 \pm 0,70	(+++)	12,50 \pm 3,53	(+)
<i>E.coli</i>	32,00 \pm 1,41	(+++)	40,00 \pm 7,07	(+++)
<i>K. pneumoniae</i>	13,00 \pm 0,00	(+)	12,00 \pm 0,00	(+)
<i>P. aeruginosa</i>	6,00 \pm 0,00	(-)	10,50 \pm 0,70	(+)

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

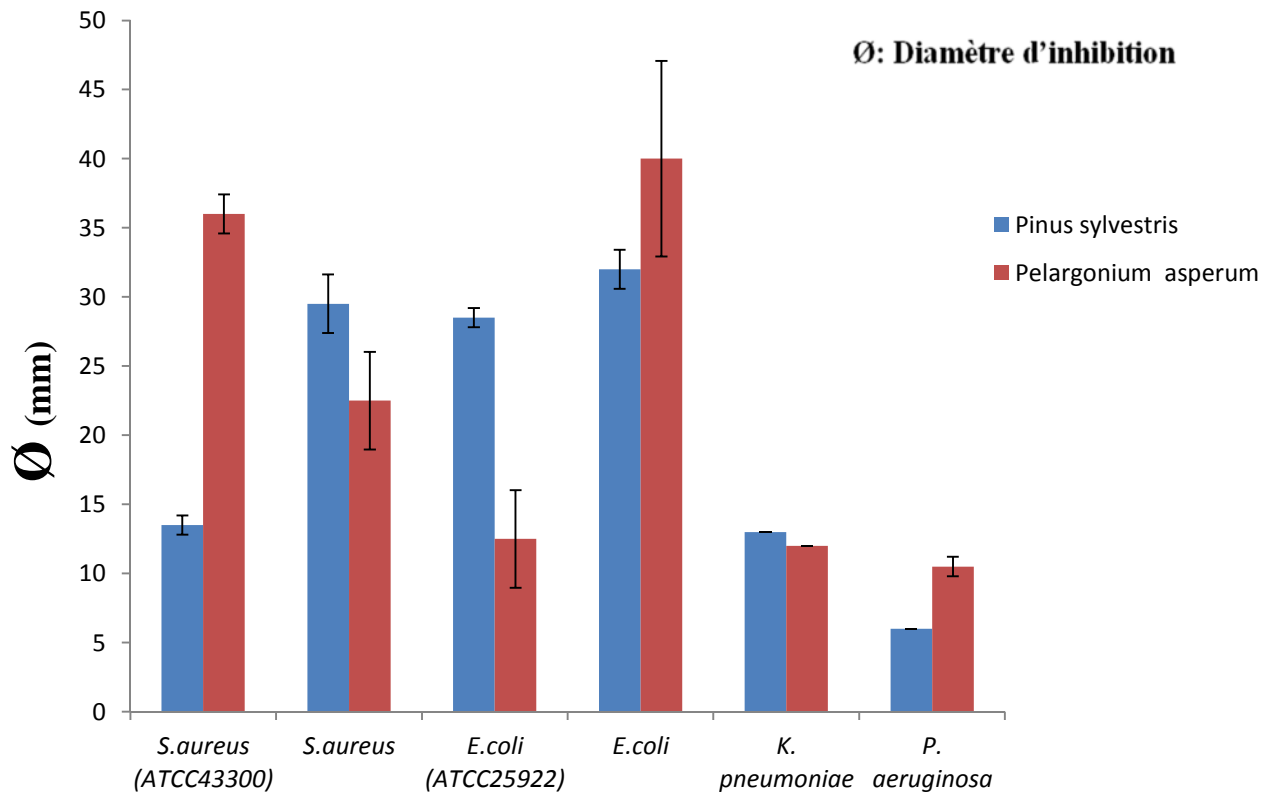


Figure 19: Représentation graphique des résultats du test de sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis des deux huiles essentielles *Pinus sylvestris* et *Pelargonium asperum*

D'après l'histogramme représenté dans la figure 19, nous constatons que toutes les souches bactériennes sont sensibles aux deux huiles essentielles *Pinus sylvestris* et *Pelargonium asperum* à l'exception de *P. aeruginosa* qui n'a montré aucun diamètre d'inhibition vis-à-vis de *Pinus sylvestris*.

Nous remarquons des diamètres d'inhibition élevés chez *E. coli* et *S. aureus* pour les deux huiles essentielles. Pour *E.coli* (ATCC25922) et *S.aureus* (ATCC43300), elles ont montré une grande sensibilité vis -a- vis de l'HE *P. sylvestris* et *P. asperum* respectivement.

Les huiles essentielles étudiées ont montré des degrés d'activité antimicrobienne variable en fonction de la bactérie cible.

La bactérie à Gram positif testée, *S. aureus* est très sensible aux deux huiles essentielles avec un diamètre de 29,5 mm pour *P. sylvestris* et de 22,5 mm pour *P. asperum*. Comparée aux antibiotiques utilisés comme témoins positifs, cette souche est résistante à Amoxicilline et Gentamicine mais sensible à Oxytétracycline.

Par contre *S.aureus* (ATCC43300) est extrêmement sensible seulement envers *P. asperum* ; avec un diamètre de 36 mm mais sensible aux trois antibiotiques utilisées comme témoins positifs qui sont Amoxicilline, Gentamicine et Oxytétracycline.

En ce qui concerne les bactéries à Gram négatif *E.coli* (ATCC25922), *E.coli*, *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa*; elles sont toutes sensibles aux deux huiles essentielles en précisant que *E.coli* est la plus sensible avec des diamètres de 32 mm envers *P. sylvestris* et 40 mm envers *P. asperum*. Par contre *E.coli* (ATCC25922) présente un diamètre de 28,50 mm avec *P. sylvestris*.

Il faut noter que les bactéries à Gram négatif étudiées sont toutes résistantes à Amoxicilline et sensibles à Gentamicine et Oxytétracycline.

On déduit que les deux huiles essentielles *Pinus sylvestris* et *Pelargonium asperum* ont manifesté une activité antimicrobienne importante.

SELADJI (2014), a évalué la sensibilité de quelques bactéries vis-à-vis des huiles essentielles de *Pinus pinea*, *Pinus pinaster* et *Pinus halepensis* provenant des stations de Nadroma (Maroc). Les résultats ont montré que les souches bactériennes à Gram (+) testées sont très sensibles aux huiles essentielles des trois *Pinus*, notamment contre *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115). En revanche, les trois *Pinus* n'ont pas révélé le même pouvoir antibactérien contre l'ensemble des souches à Gram (-) testées qui sont *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 70063) et *Escherichia coli* (ATCC 25922). Nos résultats concordent avec ces travaux, mis à part pour *E.coli* et *E.coli* (ATCC25922) qui ont exprimé une forte sensibilité vis-à-vis de notre huile étudiée (*Pinus sylvestris*).

Les travaux de FEKIH (2015), ont montré une activité moyenne vis-à-vis des bactéries à Gram-négatif *K. pneumoniae* (zone d'inhibition de 12mm et 10 mm) pour l'huile essentielle de *P. pinea* et *P. halepensis* respectivement. Aussi l'huile essentielle de *P. halepensis* a montré un effet inhibiteur moyen contre *A.baumannii*. Nous remarquons aussi que les trois

huiles n'ont montré aucun effet contre *P.aeruginosa*, *S. typhimurium*, *E. coli*, *E.cloacae*, *C. freudii* et *P. mirabilis*.

De plus, l'huile essentielle de *P. pinaster* a montré aussi une activité moyenne vis-à-vis de la souche bactérienne à Gram-positif *Enterococcus faecalis* (zone d'inhibition de 12 mm). Aucune zone d'inhibition n'est observée autour des disques à la charge 10 µL contre 8 micro organismes à Gram-négatifs et à Gram-positifs parmi lesquels : *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, l'huile est inactive contre ces bactéries.

Selon le même auteur, l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *P. halepensis* de Ghazaouet (Ouest du Nord de l'Algérie) est évaluée contre quatre souches de bactéries : *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Bacillus cereus*, en utilisant la méthode de diffusion sur disque. L'huile essentielle a montré une forte activité contre *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*. Dans le contraste, l'huile est inefficace sur l'inactivation de *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*.

Toutes les études effectuées par ces auteurs sur les H.Es des espèces du genre *pinus* concordent avec nos résultats pour l'HE *Pinus sylvestris* à l'exception d'*E.coli* (ATCC25922) et d'*E.coli* qui ont montré une sensibilité élevée.

Les résultats de BEN HSOUNA et HAMDI (2012), ont montré que l'huile essentielle de *P. graveolens* avait un grand potentiel pour une activité antimicrobienne contre un groupe de micro-organismes. Le maximum des diamètres des zones d'inhibition pour les souches bactériennes, qui étaient sensibles à l'huile essentielle, se trouvaient dans la gamme de 13-24 mm. Ils ont noté chez les bactéries à gram (-) des diamètres de 13 et 14 mm pour *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 et *Salmonella enterica* respectivement. Pour les bactéries à Gram (+) des diamètres de 15 mm pour *Micrococcus luteus* ATCC 1880, 20 mm pour *Enterococcus faecalis* ATCC29212 et 14 mm pour *Staphylococcus epidermis* ATCC 12228. Sur la base des diamètres des zones d'inhibition, *Staphylococcus aureus* était plus sensible à l'huile essentielle que les autres bactéries Gram-positives avec un diamètre de la zone d'inhibition de 24 mm.

L'étude de GHANNADI *et al.* (2012), a montré que toutes les souches bactériennes testées sont sensibles vis-à-vis de l'huile essentielle *P. graveolens* d'Iran avec des diamètres de 9,5 mm pour *E. coli*, 25,3 mm pour *P. aeruginosa*, 42 mm pour *S. aureus*, 16,5 mm pour *B. subtilis* et 9 mm pour *S. enteritidis*. Par contre *L. monocytogenes* est résistante. La souche la plus sensible est *S. aureus* et cette huile essentielle a un bon effet inhibiteur sur

sa croissance. Toutes les souches sont également sensibles au contrôle antibiotique (amoxicilline et chloramphénicol).

Selon CARMEN et HANCU (2014), l'intensité de l'effet antimicrobien de l'HE *Pelargonium graveolens* est variable selon les souches bactériennes étudiées. Toutes se sont montrées sensibles à l'HE. *Staphylococcus aureus* pour les bactéries à Gram(+) et *Pseudomonas aeruginosa* pour les bactéries à Gram(-) ont montré le plus grand diamètre de la zone d'inhibition qui est de 31 mm.

Toutes ces études sont en accord avec nos résultats pour l'HE *Pelargonium asperum* qui ont révélé des zones d'inhibitions différentes envers toutes les souches cibles où les bactéries à Gram (+) *S.aureus* (ATCC43300) et *S.aureus* sont les plus sensibles avec un diamètre de 36mm et 22,50 mm respectivement et une sensibilité moyenne vis-à-vis des bactéries à Gram (-) *E.coli* (ATCC25922), *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa* mis a part *E.coli* qui est très sensible avec un diamètre de 40 mm.

Les résultats obtenus par la méthode de diffusion sur milieu gélosé ont permis de montrer que les bactéries à Gram positifs sont les plus sensibles que les Gram négatif.

Il a été fréquemment rapporté dans la littérature scientifique que les bactéries à Gram (-) résistent à l'effet inhibiteur des H.Es et leurs composants. De ce fait, plusieurs auteurs s'accordent (EL KALAMONIE *et al.* 2009 ; GILLES *et al.*, 2009 ; AL REZA *et al.*, 2010 ; ZAHER *et al.*, 2010 ; SATTANNI *et al.*, 2012 ; FADLI *et al.*, 2012). Cette résistance peut s'expliquer par le fait que les bactéries à Gram(-) sont dotées d'une couche de peptidoglycane coincée entre la membrane plasmique et une assise externe constituée de lipopolysaccharides et de protéines. Selon LECLERC *et al.* (1995), la membrane externe de lipopolysaccharides des bactéries à Gram (-) constitue une barrière d'imperméabilité aux substances hydrophobes, susceptibles d'entrer et d'empêcher la croissance bactérienne. Cependant, l'absence de cette membrane chez les bactéries à Gram (+) fait que la couche de peptidoglycane se situe à l'extérieur, ce qui permet à ces bactéries d'être plus disponibles à entrer en contact avec les H.Es (BURT, 2004). De plus, comme propriété très répandue chez les bactéries à Gram (-), c'est la présence de protéines membranaires appelées pompes à efflux, qui expulsent l'agent antimicrobien hors de la cellule avant qu'il ne puisse agir (c'est le cas de *Pseudomonas aeruginosa*), (LOUCIF, 2011).

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

Etant par nature des composés très volatils et instables, surtout s'ils sont riches en hydrocarbures insaturés, les huiles essentielles doivent être stockées dans des conditions adéquates, permettant de conserver leurs propriétés chimiques ainsi que physiques. La chaleur, la lumière (UV solaires) et l'O₂ de l'air favorisent l'oxydation des huiles essentielles. Ce qui entraîne une dénaturation de leurs molécules actives notamment polyinsaturées, et donc une perte réelle d'activité un durcissement prématuré, ou des transformations en résine, donnant lieu à une multitude de produits malodorants (aldéhydes, peroxydes etc.) responsables des phénomènes d'irritations cutanées ou des muqueuses rendant l'H.E inutilisable.

4. Résultats du test de sensibilité des souches bactériennes à la nisine

Selon la littérature, la nisine semble avoir un optimum d'activité dans des conditions acides, une concentration de 1,50mg/ml est mise en œuvre en association avec de l'HCL à 0,02N. La figure 20 montre les résultats du test de l'antibiogramme obtenu en association avec l'HCL.

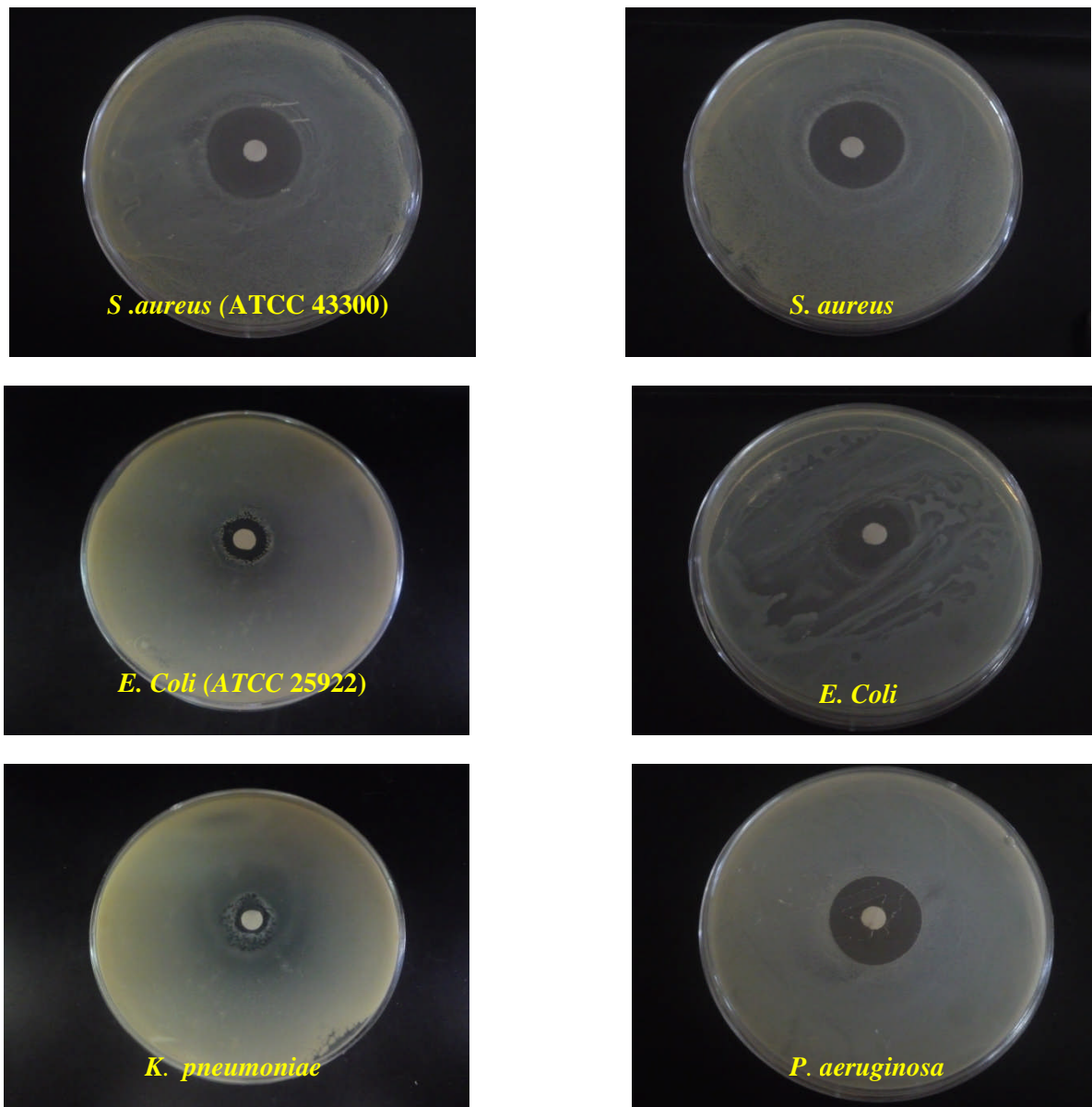


Figure 20: Résultats du test de l'antibiogramme avec la nisine à 1,5mg/ml dans de l'HCL à 0,02N.

Le tableau 9 montre les diamètres d'inhibition ainsi que la sensibilité des souches bactérienne à la concentration de 1,5mg/ml de nisine dissoute dans de l'HCL à 0,02N.

Tableau 9 : Tableau récapitulatif des résultats du test de sensibilité des souches bactériennes à la concentration de 1,5mg/ml de nisine dissoute dans de l'HCL à 0,02N.

Diamètres d'inhibition en (mm) et en moyenne des trois essais \pm l'écart type		
Dilution Souche	1,5 mg/ml nisine / HCL à 0,02N	
	Diamètre	Sensibilité
<i>S.aureus</i> (ATCC43300)	23,00 \pm 1,41	(+++)
<i>S.aureus</i>	24,50 \pm 0,70	(+++)
<i>E.coli</i> (ATCC25922)	13,50 \pm 0,70	(+)
<i>E. coli</i>	18,00 \pm 2,82	(++)
<i>K.pneumoniae</i>	12,50 \pm 0,70	(+)
<i>P.aeruginosa</i>	21,50 \pm 0,70	(+++)

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

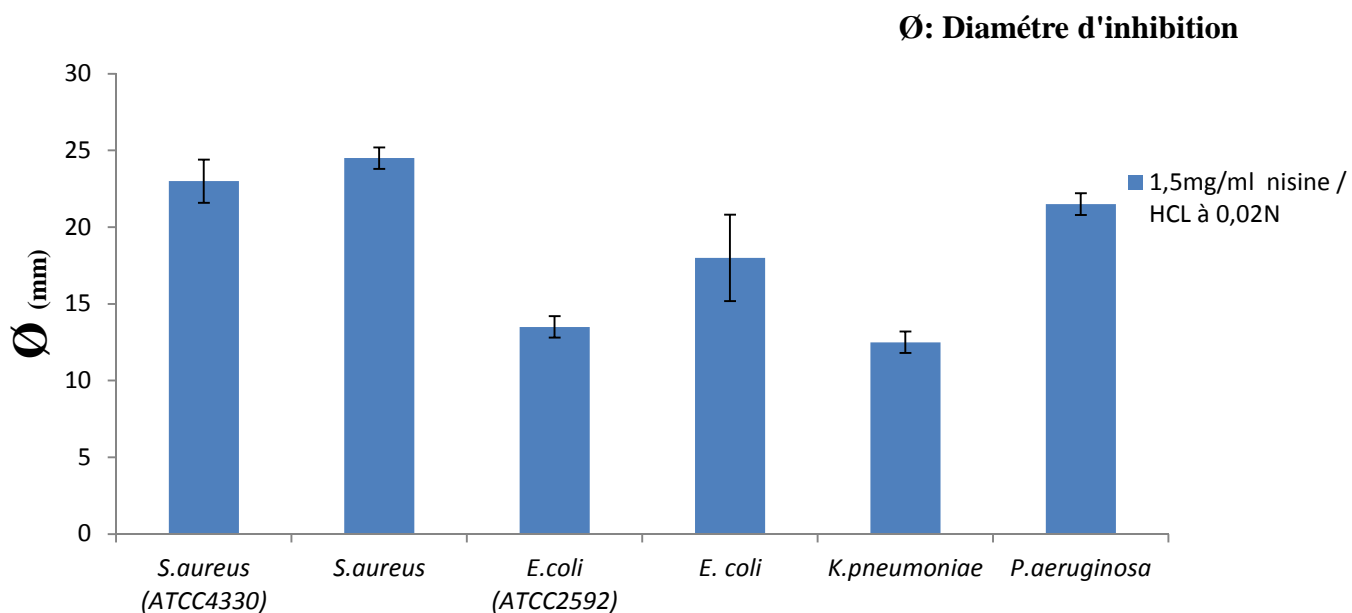


Figure 21: Représentation graphique des résultats du test de sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis de la nisine dissoute dans l'HCL à 0,02N.

Dans notre expérimentation le choix s'est porté sur la concentration de 1,5 mg/ml de nisine dissoute dans l'HCL à 0,02N en se basant sur l'étude de ARAB *et al.* (2012) qui a montré que cette concentration s'est montrée active envers toutes les souches testées notamment *S.aureus* et *P.aeruginosa* avec des zones d'inhibition importantes de 23 mm et 24,33 mm respectivement. *K.oxytoca* a montré une zone d'inhibition moyenne de 16 mm suivie d'*E.coli* avec une zone de 13,66 mm.

Nos résultats montrent que toutes les bactéries sont sensibles vis-à-vis de la nisine dissoute dans HCL à 0,02N avec des diamètres d'inhibition élevés de 24,5mm,23mm et 21,5mm vis-à-vis de *S.aureus*, *S.aureus* (ATCC4330) et *P.aeruginosa* respectivement et avec des diamètres moyens de 13,5mm,18 mm et 12,5 vis-à-vis de *E.coli* (ATCC2592), *E.coli* et *K. pneumoniae* respectivement. Ces résultats concordent avec ceux d'ELMOUALDI *et al.* (2008) qui ont testé l'effet bactéricide de plusieurs bactériocines appartenant à des bactéries de différents genres, suivant la méthode de diffusion sur milieu solide TSA, *lacococcus lactis* subsp. responsable de la production de la nisine, a été retenue pour sa forte activité bactéricide vis-à-vis des souches étudiées dont *Salmonella enteridis* et *Proteus mirabilis*. D'importantes zones d'inhibition ont été signalées avec les bactéries a Gram positif, *S. aureus* qui a manifesté un diamètre d'inhibition de 28,2 mm et les résultats obtenus avec les bactéries a Gram négatif sont plus importants avec la souche bactérienne *E. coli* qui a exprimé une zone d'inhibition de 24,3 mm suivie par *K. pneumoniae* qui a présenté un halo d'inhibition de 22,1 mm et enfin la souche de *P. aeruginosa* avec une zone d'inhibition de 21,2 mm de diamètre.

L'analyse de la variance a montré que l'activité exercée par les deux huiles essentielles et la nisine sur les souches étudiées ne présente pas de différences significatives ($P = 0,84$). Cette analyse a montré également que la sensibilité des six bactéries vis-à-vis des deux H.Es et la nisine ne présente pas de différences significatives ($P = 0,11$) (Voir tableau1 et 2, annexe 2).

AOUADHI *et al.* (2014) ont remarqué dans leurs travaux que le pH a un effet significatif dans l'inactivation des spores de *Bacillus sporothermodurans* par la nisine. En effet, la diminution du niveau du pH permet l'amélioration de l'inactivation des spores par la nisine. Par exemple, à pH 7, le taux d'inactivation des spores était de l'ordre de 0,9 log, alors qu'à pH 5, il peut atteindre 2,92 log. L'augmentation de la sensibilité des spores à la nisine à un pH acide a aussi été observée chez certaines espèces de *Bacillus*.

En effet, MANSOUR *et al.* (1998), ont constaté que le pH a un effet significatif sur l'inactivation des spores de *B. licheniformis* et le nombre des spores diminue avec la diminution du pH. De plus, l'utilisation de la nisine seule n'avait aucun effet sur les spores mais leur combinaison avec le pH améliore leur efficacité antimicrobienne.

De même, CRISTINA *et al.* (2005), ont montré que l'effet inhibiteur de la nisine sur certaines espèces bactériennes à savoir *B. subtilis*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* et *Str. thermophilus* augmente avec l'augmentation de l'acidification du milieu du traitement.

Ces auteurs ont constaté que la faible valeur du pH et la nisine agissent en synergie pour détruire complètement les bactéries utilisées.

LI *et al.* (2005) ont montré que le niveau élevé du pH (10) en combinaison avec la nisine (100 ug/ml) peut être utilisé pour détruire les bactéries pathogènes à savoir les espèces de *Salmonella* et *Staphylococcus aureus* dans la viande.

Le pH joue un rôle important dans l'activité des bactériocines de plusieurs manières. Il modifie la solubilité de la bactériocine: la nisine est quasi insoluble à pH neutre ou alcalin.

D'une manière générale, les bactériocines de bactéries lactiques possèdent de nombreux résidus d'acides aminés chargés sur lesquels le pH du milieu peut avoir une grande incidence. Ceci explique les différences d'activité observées en fonction de l'acidité (LIU et HANSEN, 1990).

La nisine est la bactériocine la plus commercialisée, produite par *Lactococcus lactis subsp. lactis*, qui présente une activité antimicrobienne contre une large gamme agissant essentiellement sur les formes végétative et sur les spores des bactéries à Gram-positives. En outre, la nisine a été autorisée dans les viandes transformées comprennent les limites de 12,5 mg / kg aux Etats-Unis (Food and Drug Association) et a surtout été appliquée aux produits laitiers et carnés comme une cible d'agents pathogènes à Gram positif (principalement des *Listeria monocytogenes*) (BALCIUNAS *et al.*, 2013).

5. Concentrations minimales inhibitrices (CMI)

5.1. Résultats des CMI réalisées avec *Pinus sylvestris* et *Pelargonium asperum*

Le tableau suivant résume les valeurs de CMI des deux HE de *Pinus sylvestris* et *Pelargonium asperum* vis-à-vis des bactéries *S.aureus* (ATCC43300), *S. aureus* et *E. coli*

Tableau 10 : Les valeurs des CMI des deux huiles essentielles de *Pinus sylvestris* et *Pelargonium asperum* sur les bactéries testées [*S.aureus* (ATCC43300), *S. aureus* et *E. coli*] en µl/ml.

Huiles essentielles		<i>S. aureus</i> (ATCC43300)	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
<i>P. sylvestris</i>	CMI	-	15,84 µl/ml	ND
<i>P. asperum</i>	CMI	3,96 µl/ml	1,98 µl/ml	-

ND : non déterminé.

- : non testé.

L'étude préliminaire *in vitro* a révélé que, les deux huiles essentielles *Pinus sylvestris* et *Pelargonium asperum* ont montré une activité antimicrobienne. Cette activité est confirmée par une étude complémentaire suite à la détermination des CMI.

Cependant, d'après les résultats d'aromatogramme, *S. aureus* et *E.coli* ont révélé une sensibilité élevée envers l'H.E de *P. sylvestris*. L'H.E de *P. asperum* quant à elle a montré une activité considérable contre *S. aureus* (ATCC43300) et *E. coli*.

Les CMI ont été déterminées sur la base de ces résultats et les valeurs obtenues varient en fonction de l'HE étudiée et de la souche microbienne testée.

L'H.E de *Pinus sylvestris* a montré un effet inhibiteur contre la souche *E.coli* à la dilution (12,50%) qui correspond à la concentration de 15,84 µl/ml. L'H.E de *Pelargonium asperum* a inhibé la croissance de deux souches microbiennes *S. aureus* (ATCC43300) à la dilution (3,12%) qui correspond à la concentration de 3,96 µl/ml, et *E. coli* à la dilution (1,50%) qui correspond à la concentration 1,98 µl/ml.

Les subcultures réalisées suite à l'obtention des CMI ont permis d'observer une action bactéricide de L'H.E de *Pinus sylvestris* sur *E. coli*, et une action bactériostatique de l'H.E de *Pelargonium asperum* sur *S. aureus* (ATCC43300) et *E. coli*.

Il est à noter que l'activité antimicrobienne d'une huile essentielle est due, principalement, à sa composition chimique, et en particulier, à la nature de ses composés majoritaires (VASCONCELOS SILVA *et al.*, 1999). Elle peut être attribuée, aussi, à une ou plusieurs molécules, présente(s) en faible(s) proportion(s) dans les huiles essentielles (KÖNIG *et al.*, 2001). Cela explique les résultats contradictoires de plusieurs auteurs.

DERWICH *et al.* (2009); SEWANU (2012) et CHOUITAH *et al.* (2013) ont démontré que des bactéries à Gram (-) comme *E. coli* peuvent être sensibles à de faibles concentrations d'H.Es, selon les huiles essentielles étudiées.

BENABDERRAHMANE *et al.* (2009), ont testé l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de la résine de *Pistacia atlantica Desf*, récoltée dans trois stations de l'Ouest et le Sud-Ouest de l'Algérie vis-à-vis des bactéries à Gram (+), à Gram (-) et des souches fongiques. Les huiles essentielles ont révélé un grand pouvoir antibactérien vis-à-vis de *S. aureus* et *E. faecalis* avec des concentrations minimales inhibitrices inférieures à 10 µg/ml ; cependant, les autres espèces à Gram(-) et les souches fongiques nécessitent des fortes concentrations minimales inhibitrices : 10² µg/ml pour *E.coli*, *K.pneumoniae* et *P.aeruginosa*, et une CMI de 10³ µg/ml pour *Enterobacter cloacae*. Des résultats similaires ont été obtenus par d'autres études récentes de RAMTIN *et al.* (2013) et DAI *et al.* (2013), où ces auteurs ont constaté que les Gram (+) sont plus sensibles que les Gram (-). Cependant, la concentration minimale inhibitrice est peut-être la même chez certaines bactéries Gram (+) et Gram (-), ce qui était d'ailleurs montré par ATTOU (2011) et LIMA *et al.* (2013).

Les résultats de SELADJI (2014), confirment par la méthode de dilution CMI que la souche *Bacillus cereus* (ATCC11778) donne la meilleure activité antimicrobienne puisqu'elle représente la plus petite concentration inhibitrice pour *P. pinaster*. Ainsi les souches *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115) et *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) donnent une bonne activité avec *P.halepensis* et *P.pinea*. D'autre part, les bactéries *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 70063) et *Escherichia coli* (ATCC 25922) possèdent une faible sensibilité vis-à-vis des trois *Pinus*.

FEKIH (2014), a montré que le résultat le plus prometteur de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *P.halépinsis* avait la valeur de CMI la plus faible (28,4µg/ml) contre *Pseudomonas aeruginosa*

L'huile essentielle de *P. pinea* a également montré un effet antimicrobien contre *Staphylococcus aureus* avec une CMI de 113,63 µg /ml.

Selon DJAHOUDI (2015) , l'activité antibactérienne de l'huile essentielle *Pelargonium graveolens* sur une population bactérienne composée de cent trente souches isolées d'infections communautaires a montré que la valeur moyenne des concentrations minimales inhibitrices (CMI) est de 1%. Toutes les souches testées sont sensibles à des concentrations inférieures ou égales à 2% d'huile essentielle. On enregistre une meilleure activité sur les cocci à Gram positif avec des CMI variant de 0,1% à 0,5%.

L'étude de BIGOS *et al.* (2012) sur l'huile de géranium obtenu à partir de *Pelargonium graveolens* a montré une très forte activité contre la souche de *S. aureus* (ATCC 43300) et aussi contre les souches de *S. aureus* examinés obtenu à partir des matières cliniques. Les valeurs de CMI contre des souches cliniques de *S. aureus* ont varié de 0,25 ul / ml à 2,5 ul / ml. La croissance de la souche *S. aureus* (ATCC 433000), a été inhibée par 0,25 ul / ml de l'huile testée. La majorité des souches de *S. aureus* étudié: 47 sur 70, ont été sensibles à l'huile de *Pelargonium graveolens*.

6. Résultats de la combinaison des huiles essentielles avec la nisine

Afin d'étudier l'activité antibactérienne des huiles essentielles (*Pinus sylvestris* et *Pelargonium asperum*) en combinaison avec la nisine, des combinaisons ont été effectuées avec trois concentrations différentes : 50 % d'huile essentielle avec 50% de nisine ; 75% d'huile essentielle avec 25% de nisine ; 25 % d'huile essentielle avec 75% de nisine.

Le choix des huiles essentielles utilisées pour la combinaison avec la nisine est porté sur leur efficacité qui se traduit par des zones d'inhibition importantes obtenues dans les tests d'aromatogramme.

6.1. Résultats des témoins négatifs réalisés avec le DMSO et HCL à 0,02N

La figure suivante montre l'effet du DMSO et de l'HCL à 0,02N sur les souches bactériennes testées.

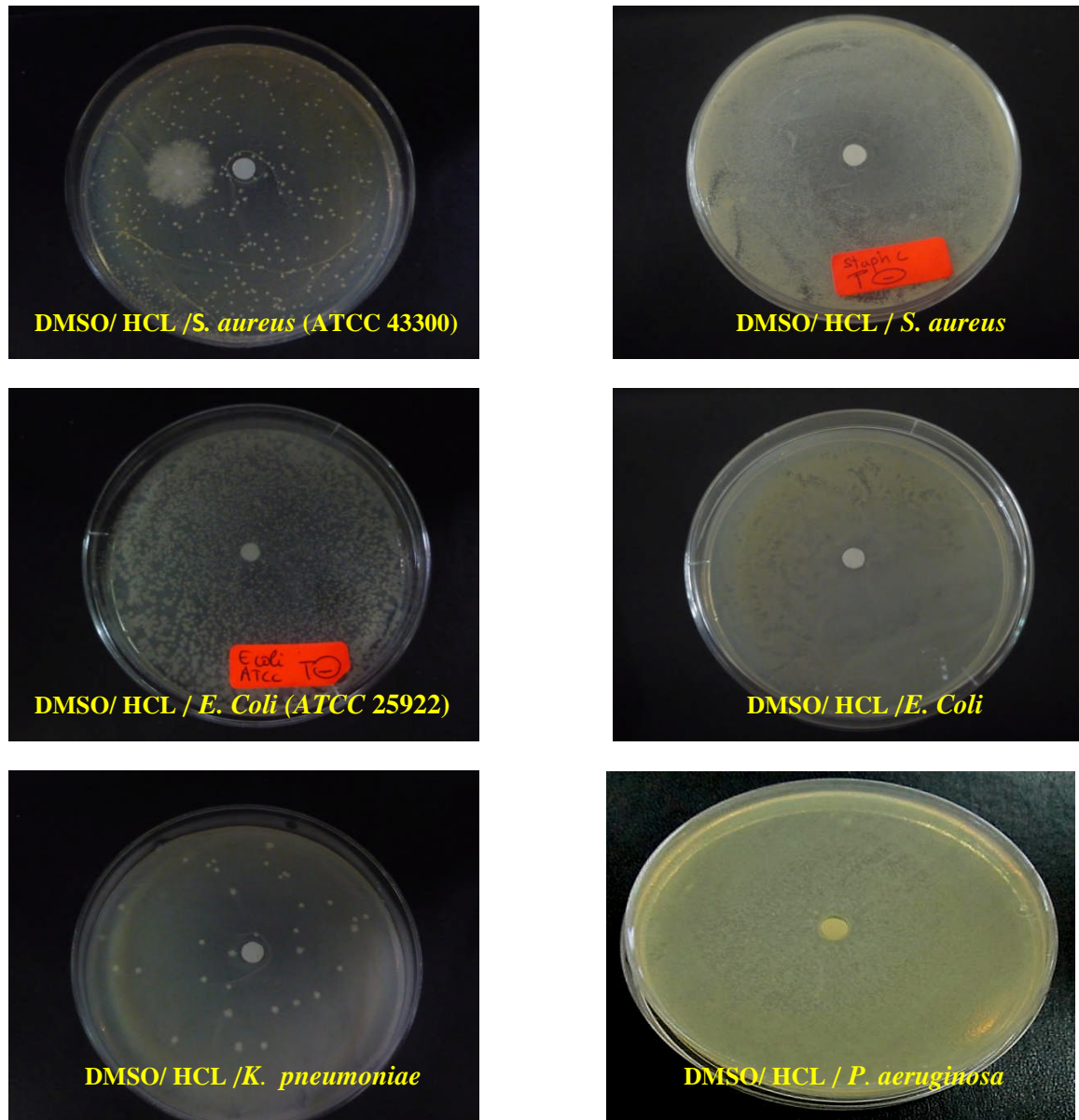


Figure 22: Témoins négatifs réalisés avec le DMSO et HCL à 0,02N sur les six bactéries testées.

6.2. Résultats de la combinaison de l'H.E de *Pinus sylvestris* avec de la nisine

Les figures 23,24 et 25 montrent l'effet des trois combinaisons de l'HE de *Pinus sylvestris* avec la nisine vis-à-vis des six souches bactériennes étudiées.

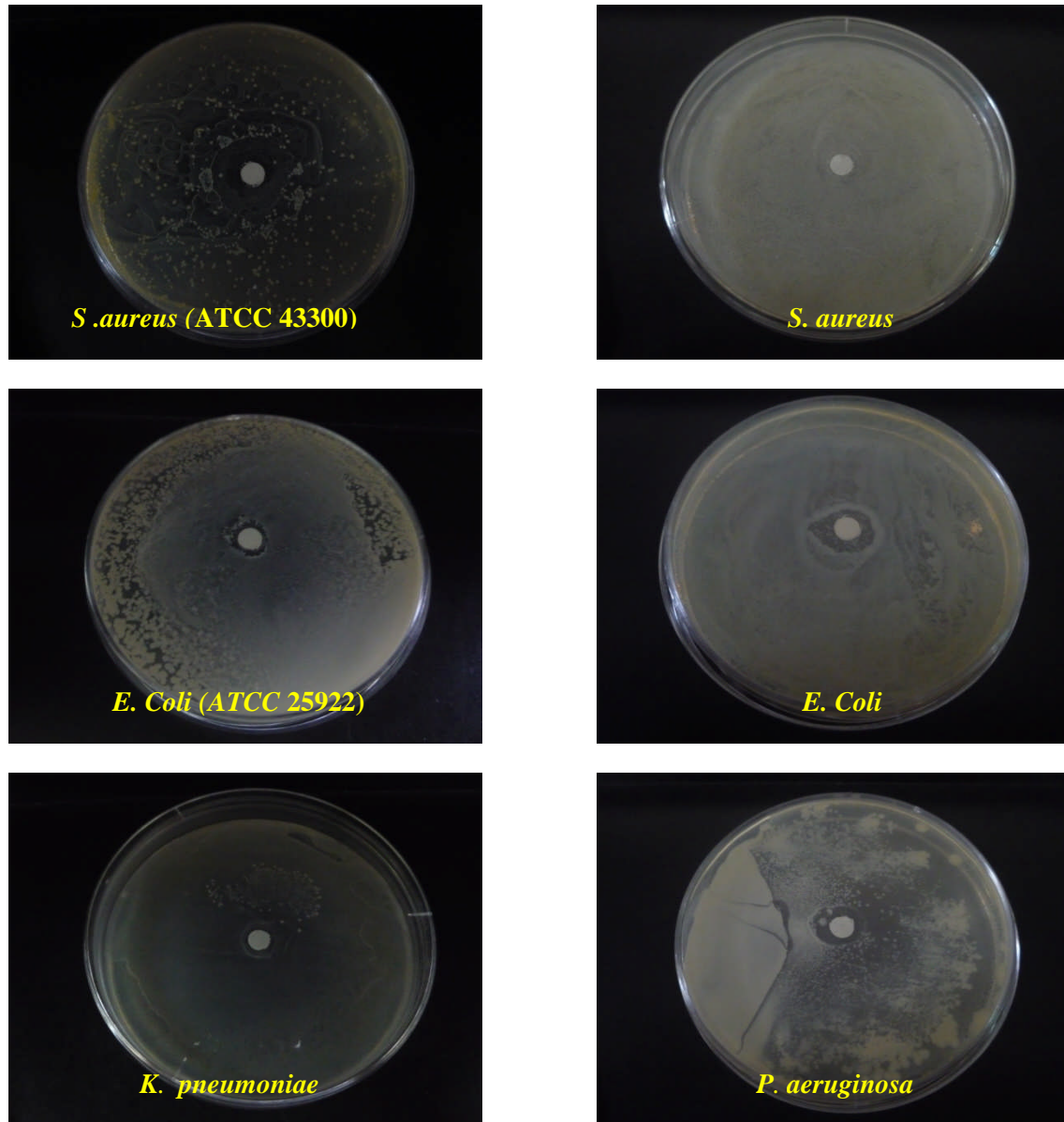


Figure 23: Résultats de la combinaison de 50% d'H. E de *Pinus sylvestris* avec 50% de nisine.

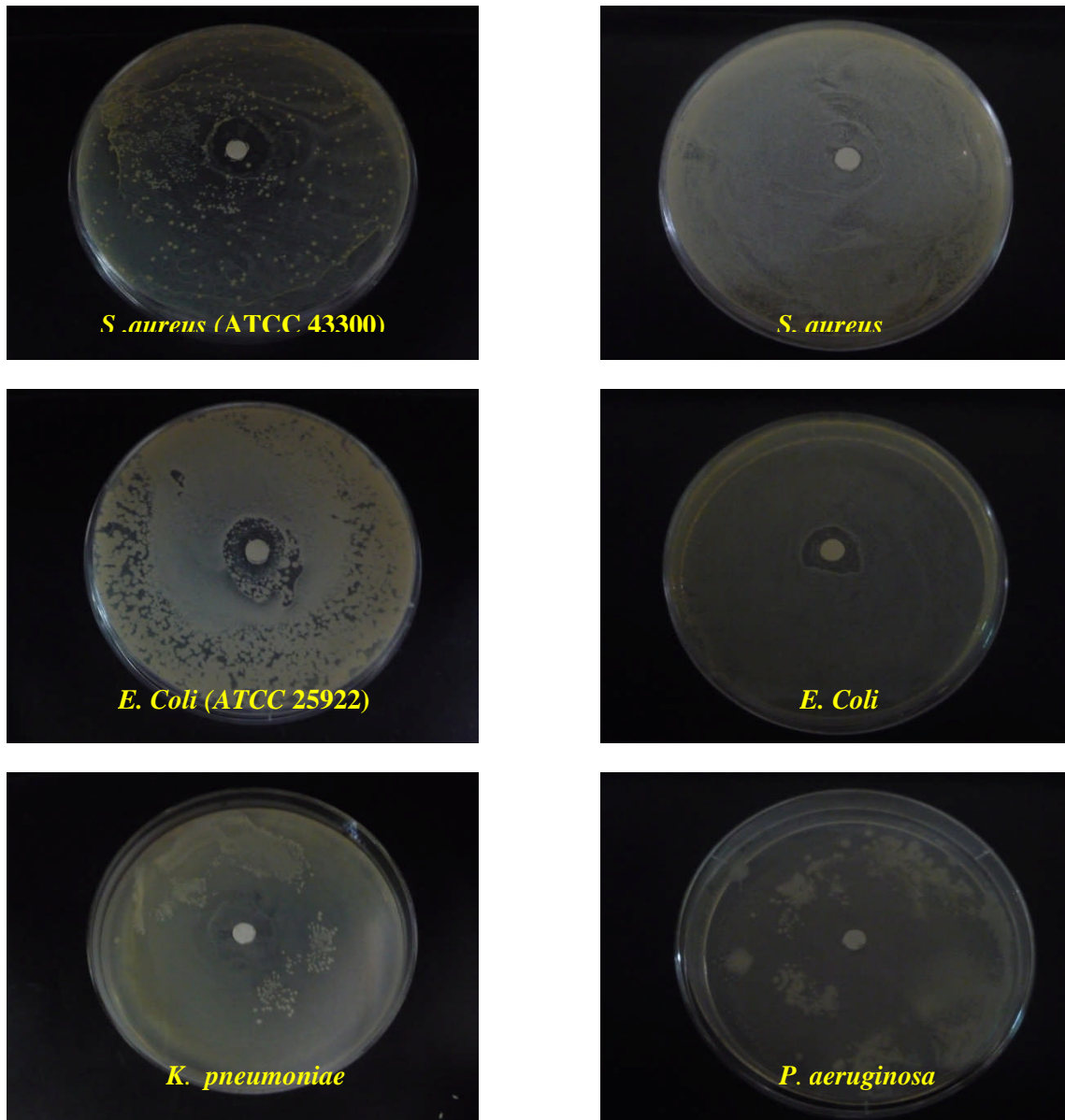


Figure 24: Résultats de la combinaison de 75% d'H.E de *Pinus sylvestris* avec 25% de nisine.

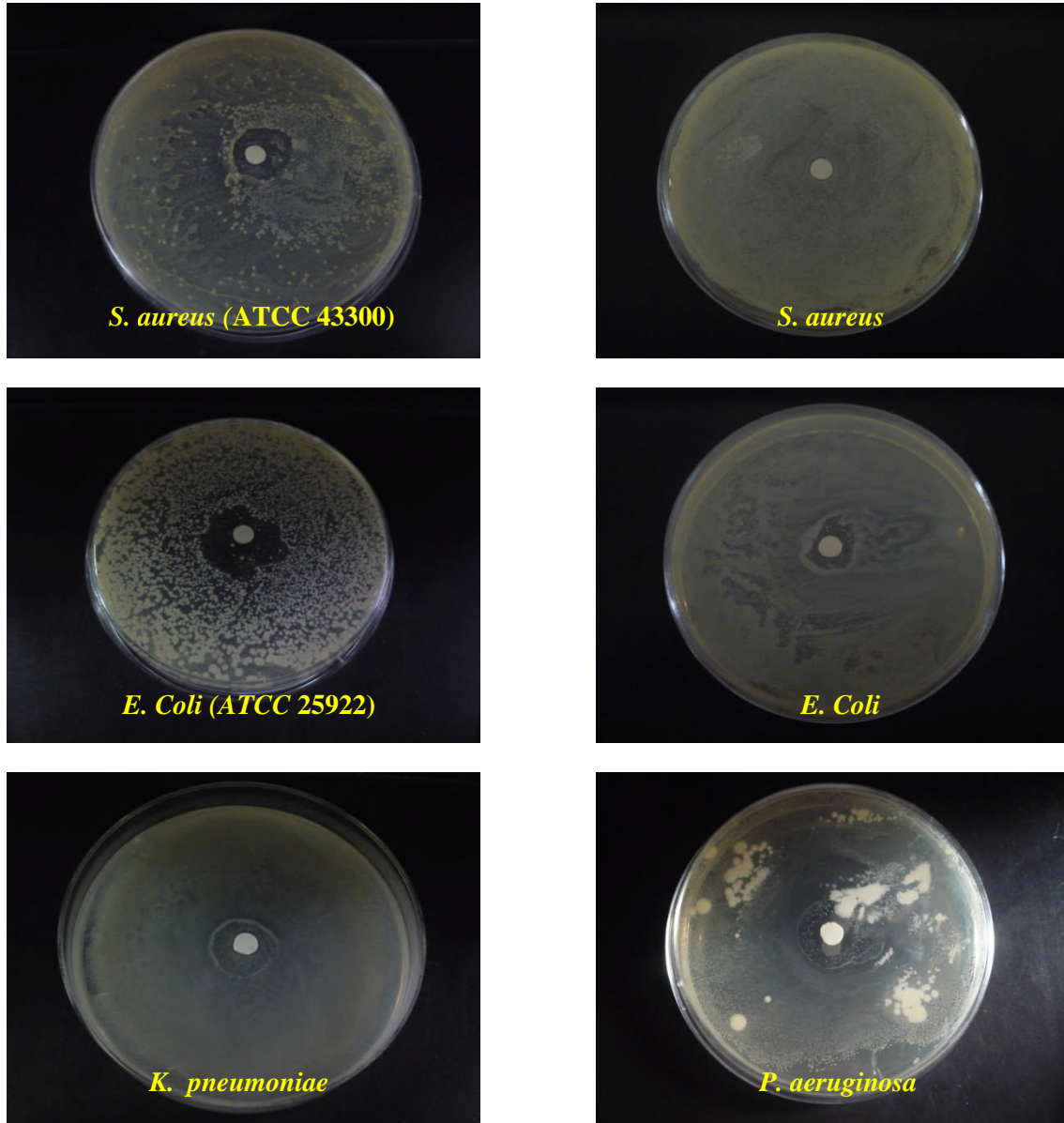


Figure 25: Résultats de la combinaison de 25% d'H.E de *Pinus sylvestris* avec 75 % de nisine.

Le tableau suivant montre les diamètres d'inhibition ainsi que la sensibilité des souches bactérienne aux trois combinaisons réalisées avec l'H. E de *Pinus sylvestris* et la nisine.

Tableau 11 : Tableau récapitulatif des résultats du test de sensibilité des souches bactériennes aux trois combinaisons réalisées avec l'H. E de *Pinus sylvestris* et la nisine.

		Diamètres d'inhibition en (mm) et en moyenne des trois essais ± l'écart type					
Dilution	Souche	50% H.E <i>Pinus sylvestris</i> et 50% Nisine		75% H.E <i>Pinus sylvestris</i> et 25% Nisine		25% H.E <i>Pinus sylvestris</i> et 75% Nisine	
		Diamètre	Sensibilité	Diamètre	Sensibilité	Diamètre	Sensibilité
	<i>S.aureus</i> ATCC43300	12,50 ± 2,12	(+)	17,50 ± 2,12	(++)	17,50 ± 2,12	(++)
	<i>S.aureus</i>	6,00 ± 0,00	(-)	6,00 ± 0,00	(-)	6,00 ± 0,00	(-)
	<i>E.coli</i> ATCC25922	10,50 ± 0,70	(+)	22,00 ± 0,00	(+++)	25,50 ± 0,70	(+++)
	<i>E. coli</i>	15,00 ± 2,82	(++)	16,00 ± 0,70	(++)	14,50 ± 3,53	(+)
	<i>K.pneumoniae</i>	6,00 ± 0,00	(-)	6,00 ± 0,00	(-)	15,00 ± 0,00	(++)
	<i>P.aeruginosa</i>	14,00 ± 1,41	(+)	6,00 ± 0,00	(-)	6,00 ± 0,00	(-)

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

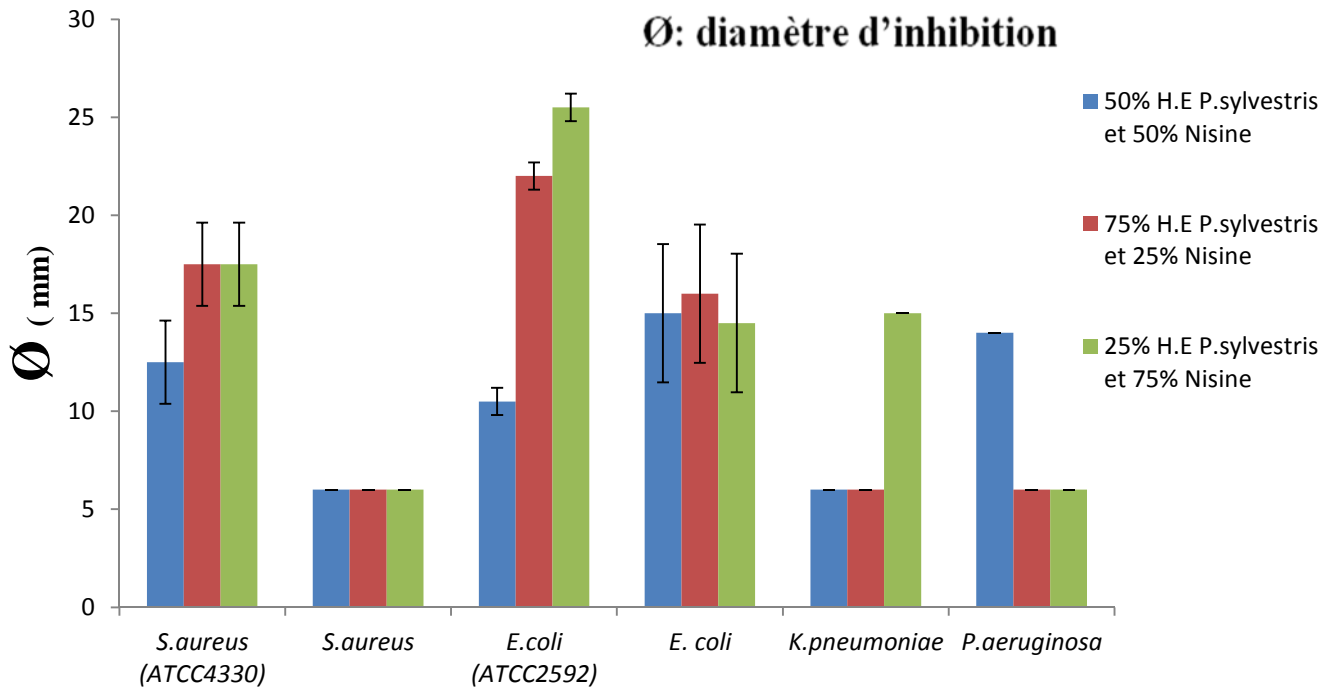


Figure 26: Représentation graphique des résultats du test de sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis de l'H.E de *Pinus sylvestris* combinée à la nisine.

D'après l'histogramme représenté dans la figure 26, nous constatons que les deux combinaisons testées de (25% de l'H.E *P.sylvestris* et 75% de nisine) et (75% de l'HE *P.sylvestris* et 25% de nisine) présentent un effet inhibiteur considérable sur *S. aureus* (ATCC43300) et *E. coli* (ATCC25922).

L'analyse de la variance a montré que l'activité des trois combinaisons (*Pinus sylvestris*-nisine) sur les bactéries étudiées présente des différences non significatives ($P = 0,65$). Celle-ci a montré aussi que la sensibilité des bactéries vis-à-vis des trois combinaisons présente des différences significatives ($P = 0,02$) (Voir tableau 3 et 5, annexe 2).

6.3. Résultats de la combinaison de l'H.E de *Pelargonium asperum* avec de la nisine

Les figures 27, 28 et 29 montrent l'effet des trois combinaisons l'H.E de *Pelargonium asperum* avec la nisine vis-à-vis des six souches bactériennes étudiées.

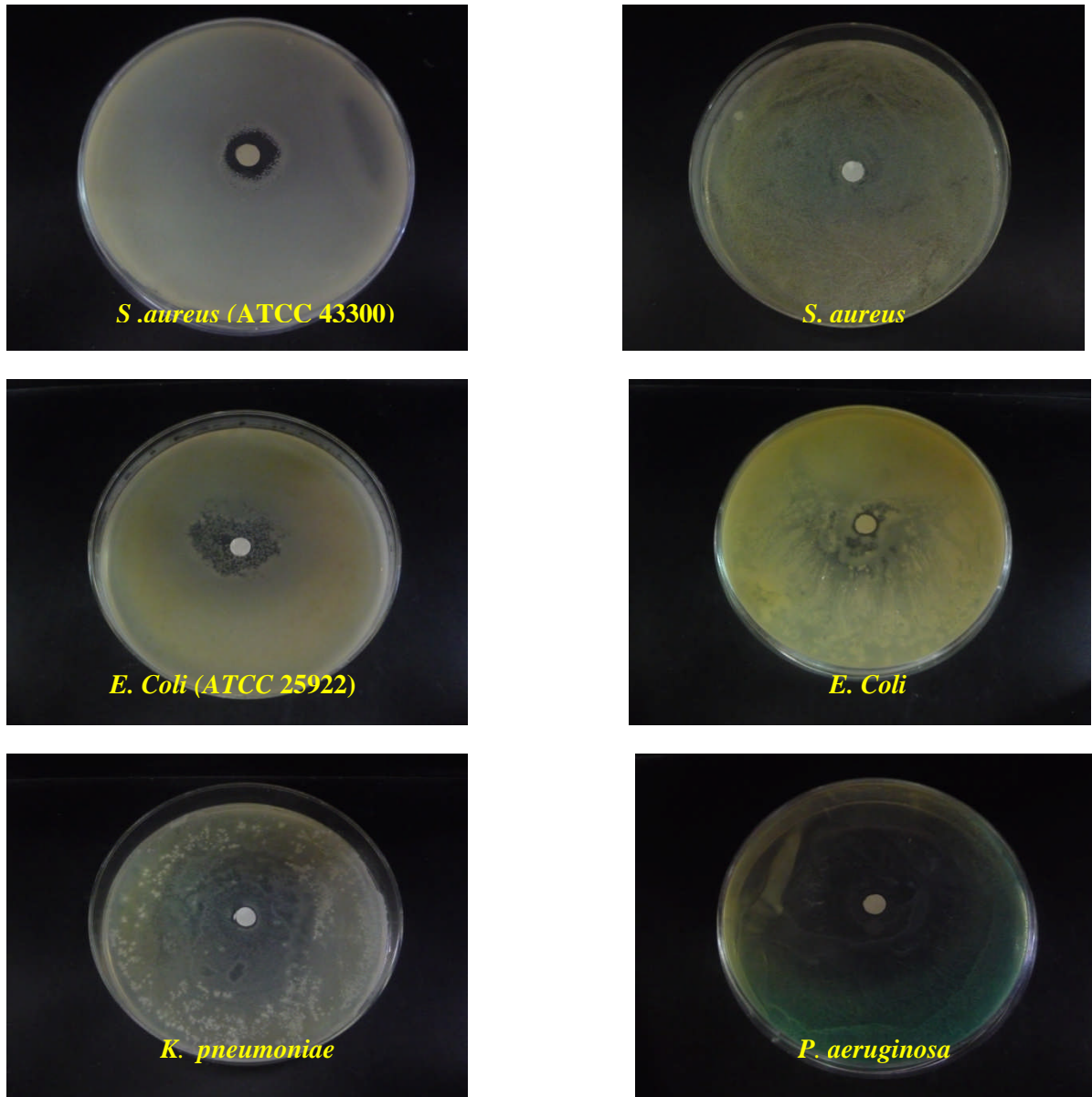


Figure 27: Résultats de la combinaison de 50% d'H.E de *Pelargonium asperum* avec 50% de nisine.

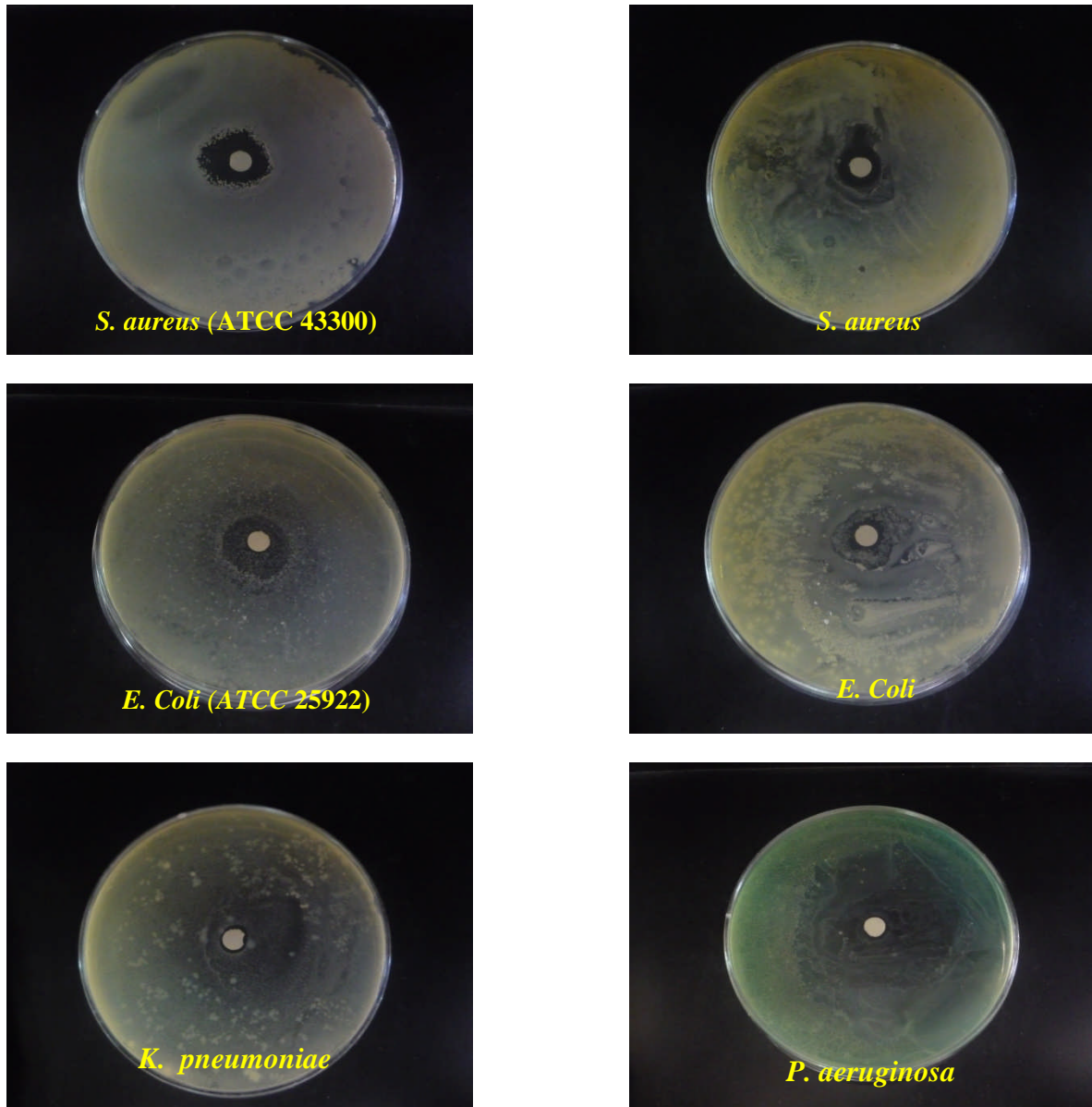


Figure 28: Résultats de la combinaison de 75% d'H.E de *Pelargonium asperum* avec 25% de nisine.

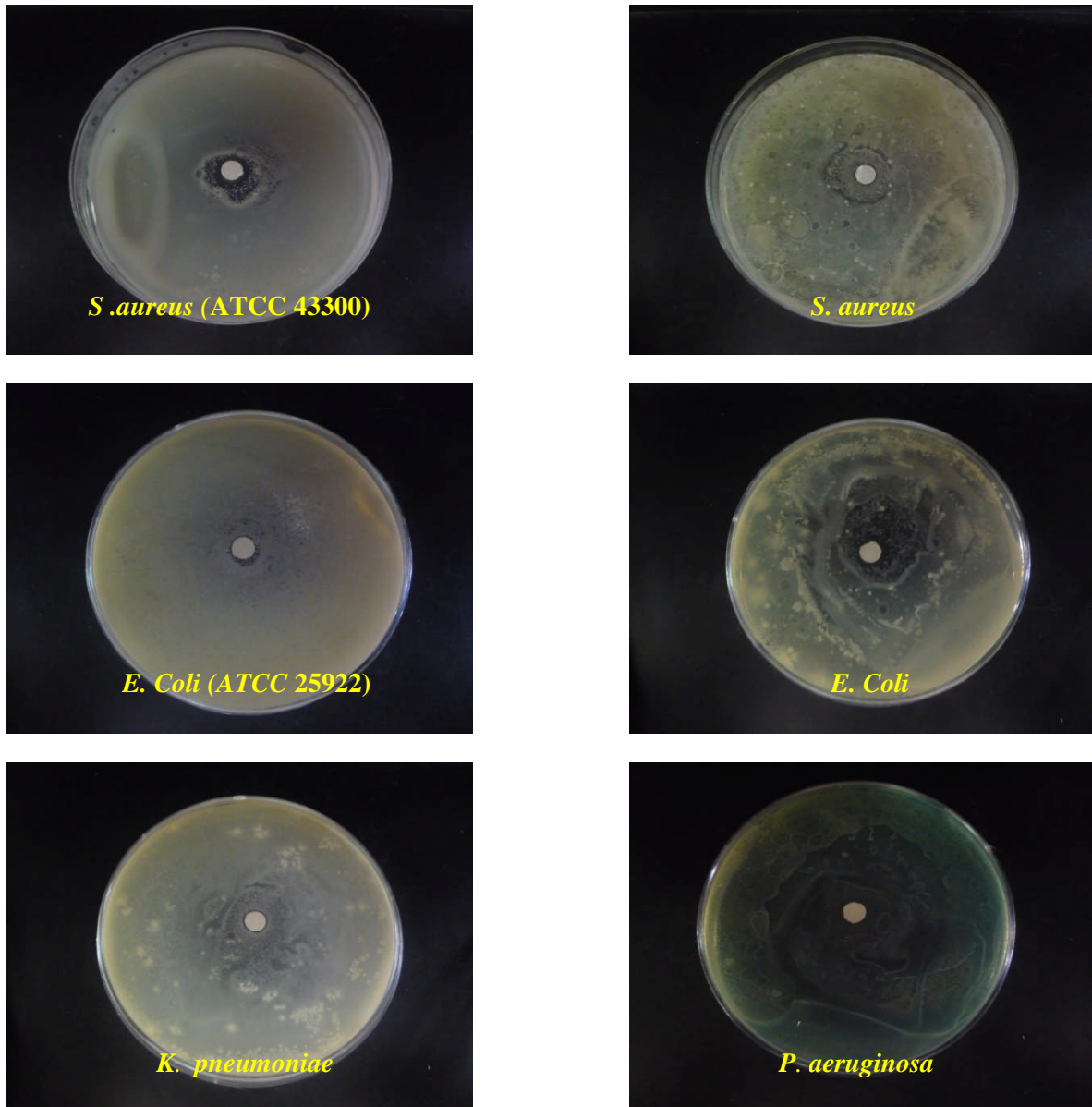


Figure 29: Résultats de la combinaison de 25% d'H.E de *Pelargonium asperum* avec 75% de nisine.

Le tableau suivant montre les diamètres d'inhibition ainsi que la sensibilité des souches bactériennes aux trois combinaisons réalisées avec l'H. E de *Pelargonium asperum* et la nisine.

Tableau 12 : Tableau récapitulatif des résultats du test de sensibilité des souches bactériennes aux trois combinaisons réalisées avec l'H. E de *Pelargonium asperum* et la nisine.

		Diamètres d'inhibition en (mm) et en moyenne des trois essais ± l'écart type					
Dilution	Souche	50% H.E <i>Pelargonium asperum</i> et 50% Nisine		75% H.E <i>Pelargonium asperum</i> et 25% Nisine		25% H.E <i>Pelargonium asperum</i> et 75% Nisine	
		Diamètre	Sensibilité	Diamètre	Sensibilité	Diamètre	Sensibilité
	<i>S.aureus</i> ATCC43300	13,50 ±0,70	(+)	21,00 ±1,41	(+++)	16,50±0,70	(++)
	<i>S.aureus</i>	6,00 ± 0,00	(-)	17,00 ±7,07	(++)	6,00 ± 0,00	(-)
	<i>E.coli</i> ATCC25922	24,50± 6,36	(+++)	20,50 ±0,70	(+++)	6,00 ± 0,00	(-)
	<i>E. coli</i>	9,50 ±0,70	(+)	20,00± 1,41	(+++)	25,00±1,41	(+++)
	<i>K.pneumoniae</i>	9,50 ± 0,70	(+)	27,50 ±2,12	(+++)	6,00 ± 0,00	(-)
	<i>P.aeruginosa</i>	57,5 ±10,60	(+++)	62,50± 3,53	(+++)	62,00±2,82	(+++)

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

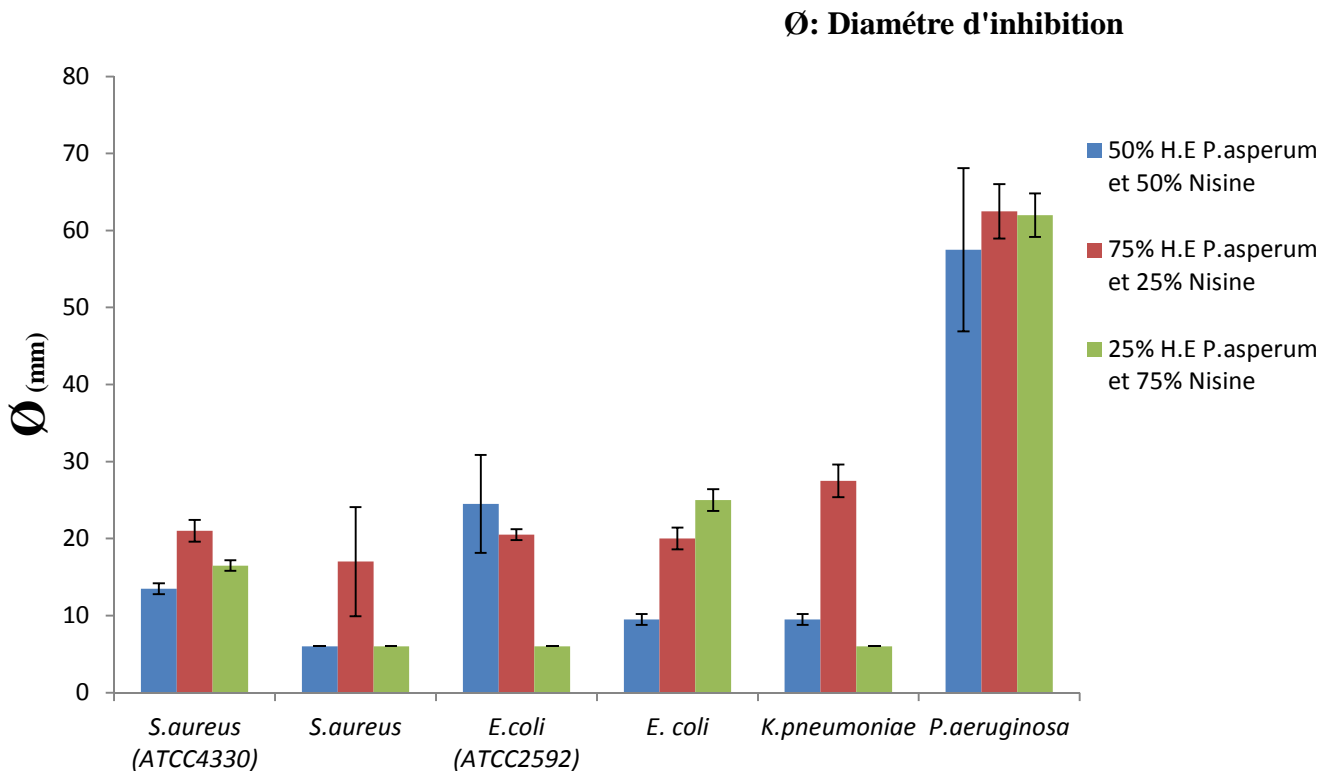


Figure 30 : Représentation graphique des résultats du test de sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis de l'H.E de *Pelargonium asperum* combinée à la nisine.

D'après l'histogramme représenté dans la figure 30, nous constatons que les trois combinaisons testées présentent un effet significatif sur la souche bactérienne *P. aeruginosa*.

Cependant un effet inhibiteur important de la combinaison 75% de l'H.E *P. asperum* et 25% de nisine sur l'ensemble des souches bactériennes; et l'effet le plus accentué est obtenu sur *P. aeruginosa* et *K. pneumoniae*. Aussi nous remarquons des effets considérables de la combinaison 25% de l'H.E *P. asperum* et 75% de nisine sur *E. coli* et la combinaison 50% de l'H.E *P. asperum* et 50% de nisine sur *E. coli* (ATCC25922).

L'analyse de la variance a montré que l'activité des trois combinaisons (*Pelargonium asperum* -nisine) envers les bactéries testées présente des différences non significatives ($P = 0,72$). Celle-ci a encore montré que la sensibilité des six bactéries présente des différences très hautement significatives ($P = 0,000033$) (Voir tableau 6 et 8, annexe2).

Le but visé dans ce travail, est d'étudier l'effet antimicrobien résultant de l'association des deux huiles essentielles avec la nisine. Des combinaisons de 50 % H.E / 50% de nisine, 75% H.E / 25 % de nisine et 25 % H.E / 75% de nisine, ont été testées. L'activité antibactérienne de chacune de ces interactions est déterminée *in vitro* par la méthode de diffusion sur gélose en mesurant le diamètre des halos d'inhibition autour des disques en (mm).

Les résultats portés dans les figures et les tableaux précédents, montrent que l'effet antibactérien varie selon la combinaison, la concentration et selon la souche bactérienne cible. La combinaison de l'H.E de *Pinus sylvestris* et la nisine, a manifesté un effet indifférent envers *K. pneumoniae* (25 % H.E *Pinus sylvestris* et 75% nisine) tandis que les deux autres combinaisons ont exercé un effet antagoniste. Les trois combinaisons ont eu un effet antagoniste vis-à-vis de *S. aureus* (ATCC43300), *S. aureus*, *E. coli* (ATCC25922), *E. coli* et *P. aeruginosa*. Pour ce qui est de la combinaison de l'H.E de *Pelargonium asperum* avec la nisine, les trois combinaisons ont montré un effet antagoniste sur *S. aureus* (ATCC43300), *S. aureus* et *E. coli*. La combinaison 50 % H.E et 50 % de nisine a exercé un effet additif envers *E. coli* (ATCC25922), citant également un effet synergique sur *P. aeruginosa* avec les trois combinaisons et sur *K. pneumoniae* avec la combinaison de (75 % H.E *Pelargonium asperum* et 25% nisine).

L'effet synergétique résultant de la combinaison des antibiotiques avec les H.Es est souvent étudié par plusieurs auteurs. ADWAN et MHANA (2008), ont évalué l'interaction

entre différentes huiles essentielles avec d'autres agents antimicrobiens, en citant les antibiotiques tels que : la Pénicilline G et la Gentamycine contre cinq souches de *S. aureus* : une souche résistante à la méthicilline et quatre souches sensibles à la méthicilline. Suivant la méthode de diffusion et la CMI, les résultats ont montré un effet synergétique entre les combinaisons antibiotique-huiles essentielles avec une réduction significative dans les CMI vis-à-vis de ces souches microbiennes. KALPNA et CHANDA (2012), ont opté à conclure qu'il y a une amélioration importante dans l'activité grâce aux combinaisons réalisées entre les H.Es et les antibiotiques, dont l'effet le plus marqué était avec l'H.E de *Caricapapaya* associée aux différents antibiotiques, dont cette huile seule n'a exercé aucun effet antibactérien.

D'autres travaux visent à utiliser d'autres composés chimiques tels que le vinaigre, comme les travaux de GUL *et al.* (2012) sur l'association vinaigre-H.E qui a exercé une activité antibactérienne. Il a été montré que cette activité est principalement due au vinaigre. HINDI (2013), quant à lui, il a testé l'effet individuel et combiné de l'extrait aqueux d'*Allium sativum* et le vinaigre de pomme, l'association a permis une forte sensibilité de toutes les bactéries utilisées, alors que le vinaigre seul a montré une légère sensibilité vis-à-vis de ces bactéries. Une autre étude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle en combinaison avec la nisine a été également réalisée par ARAB *et al.* (2012), la combinaison 50 % HE d'*Urtica dioïca* et 50 % nisine a montré un effet synergétique vis-à-vis de *Klebsiella oxytoca*. Par contre, *S. aureus* et *E. coli* ont été indifférentes aux combinaisons 25 % de l'H.E d'*Urtica dioïca* 75 % nisine et 25 % de l'H.E de *Ruta tuberculata* - 75 % nisine, respectivement.

Une autre étude d'AKROUN et HARRANI (2011), à tester l'activité antibactérienne d'extrait de feuilles d'olivier (extrait brut et oleuropéine) en combinaison avec la nisine. La combinaison de la nisine avec l'extrait brut a amélioré la sensibilité de *S. aureus* et *E. coli* d'un diamètre de 15,33 mm à 37 mm, et de 10 mm à 20 mm respectivement. Ainsi, l'application de l'oleuropéine associée à la nisine a montré une forte sensibilité de *S. aureus* (35 mm) et *E. coli* (32 mm) comparée aux diamètres de l'oleuropéine seul.

Conclusion et perspectives

Ce travail a été mené dans le cadre de l'étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles extraites des feuilles de *Pinus sylvestris* et *Pelargonium asperum*.

Les résultats indiquent que l'huile essentielle de *Pinus sylvestris* a exercé une activité antibactérienne importante à l'encontre des trois bactéries *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (ATCC25922) et *Escherichia coli*; par contre *Pseudomonas aeruginosa* lui est résistante. Quant à L'H.E de *Pelargonium asperum*, celle-ci a révélé une activité significative envers les bactéries *Staphylococcus aureus* (ATCC43300), *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*.

L'étude de l'activité antibactérienne de la nisine en association avec de l'HCL à 0,02N a témoigné un effet inhibiteur sur les six souches bactériennes testées.

Une étude plus poussée de l'activité antibactérienne de l'H.E de *Pinus sylvestris* en combinaison avec la nisine a permis d'observer un effet indifférent envers *Klebsiella pneumoniae* et un effet antagoniste vis-à-vis des autres bactéries étudiées.

L'huile essentielle de *Pelargonium asperum* combinée avec la nisine quant à-elle, a montré un effet synergique sur *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*, additif envers *Escherichia coli* (ATCC25922) et un effet antagoniste sur *Staphylococcus aureus* (ATCC43300), *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*.

L'ensemble des résultats obtenus *in vitro* ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances de source naturelle biologiquement actives. Il serait donc intéressant de continuer ces travaux par:

- Une analyse de la composition chimique des deux huiles essentielles par la technique de GC/MS (Chromatographie en phase gazeuse- spectrométrie de masse);
- Une étude de l'effet de la combinaison de ces huiles essentielles entre elles, leurs interaction avec la nisine ou avec des antibiotiques afin d'améliorer leurs activités ;
- L'application sur une large gamme de bactéries et de champignons;
- L'étude de la toxicité de ces huiles essentielles.
- Isolement des molécules bioactifs.

AL-REZA S.M.; ATIQR R. ; JONGHWI L. ; SUN CHUL K. (2010). Potential roles of essential oil and organic extracts of *Zizyphus jujube* in inhibiting food-borne pathogens. *Food chem.* 119, 981-986.

AZALENKO K. (1995). Contribution à la détermination des chemotypes d'une plante à huile essentielle du Togo : *Lippia mutiflora*. Mémoire d'ingénieur de travaux, ESTBA, Université Lomé.

ALEKSHUN M.N.; LEVY S.B. (2007). Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell.* 128, 1037-1050.

ABEE T. (1995). Pore-forming bacteriocins of Gram-positive bacteria and self-protection mechanism producer organism. *FEMS Microbiol. Letters.* 129, 1-10.

ATTOU A. (2011). Contribution à l'étude phytochimique et activités biologiques des extraits de la plante *Rutachalepensis* (Fidjel) de la région d'Ain Témouchent. Thèse de magister de l'Université Abou BekrBelkaid, Tlemcen, Alger.

ARAB L. ; OUDAFAL N.; OULD L'HADJ T. (2012). Etude in vitro de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Rutatu berculata*, *Ocimum basilicum L* et *Urtica dioica* en combinaison avec la Nisine sur des souches bactériennes pathogènes. Thèse d'Ingénieur d'état l'Université Mouloud Mammeri. Tizi-Ouzou, Alger.

AKROUN N. ; HARRANI F. (2011). Contribution à l'amélioration de l'activité antibactérienne d'extrait de feuilles d'olivier par addition de la nisine, et leurs applications à la conservation de la viande hachée bovine. Ingénieur d'état en Science Agronomique. Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou.

AOUADHI C. ; ROUISSI Z. ; MEJRI S. ; MAAROUFI A. (2014). Effet des facteurs environnementaux sur l'inactivation des spores de *Bacillus sporothermodurans* par la nisine. *Nature & Technologie. B- Sciences Agronomiques et Biologiques.* n° 12, Pages 52.

BENDAHOU M.; MUSELLI A.; GRIGNON-DUBOIS M.; BENYOUCEF M.; DESJOBERT J.M.; BERNARDINI J.F.; COSTA J. (2007). Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation. *Food Chem.* 106,132-139.

BURT S. (2004).Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *Int J of food Micro.* 94, 223-253.

BENABDERRAHMANE M. ; BENALI M. ; AOUISSAT H. ; JARDAN M. ; BUESO J. (2009). Activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Pistaciaatlantica*Desf. De l'Algérie. *Phytothérapie.* 7, 304-308.

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

BALZ R. (1986). Les huiles essentielles et comment les utiliser. *Edition Lavoisier.* Paris.

BRUNETON J. (2008). Pharmacognosie – phytochimie, plantes médicinales, 2^{ème} ed Tec & Doc. Paris, 1188.

- BRUNETON J. (1999).** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. *Editions Tec & Doc Lavoisier*. Paris.1120.
- BOYLE W. (1955).** Spices and essential oils as preservatives. *Am. Perfurmer Essent. Oil Rev.* 66, 25-28.
- BIGOS M.; WASIELA M.; KALEMBA D.; SIENKIEWICZ M. (2012).** Antimicrobial Activity of Geranium Oil against Clinical Strains of *Staphylococcus aureus*. *Molecules.* 17, 10276-10291.
- BURT S.A. (2004).** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. A review. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223-253.
- BALCIUNAS E. M.; MARTINEZ F. A. C.; TODOROV S. D.; FRANCO F. D. G. M.; CONVERTI A.; OLIVEIRA R. P. S. (2013).** Novel biotechnological applications of bacteriocin: A review. *Food Control.* 3, 134–142.
- BURITS M.; BUCAR, F. (2000).** Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oils. *Phyto Research.*14, 323–328.
- BERAOUD L. (1990).** Effet de certains épices et plantes aromatiques et leurs extrait sur la croissance et la toxinogénèse d'*Aspergillus parasiticus* NRRL 2999. Thèse 3ème cycle. Faculté des sciences de Rabat. Maroc.
- BEUCHAT L.R. (1976).** Sensitivity of *Vibrio parahaemolyticus* to spices and organic acids. *J. Food. Sc.* 41, 899-902.
- BRIAN Y. M. (2012).** Aspects De La Résistance Bactérienne Aux Antibiotiques. Edition L'Harmattan., Paris. 11-37.
- BEN HSOUNA A.; HAMDI N. (2012).** Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oils and organic extracts from pelargonium graveolens growing in Tunisia. *Hosanna and Hamdi Lipids in Health and Disease.* 11-167.
- BILGRAMI K.S. ; SINHA K.K ; SINHA A.K (1992).** Inhibition of aflatoxin production and growth of *Aspergillus flavus* by eugenol, onion, and garlic extracts. *Indian. J. Med. Res.* 96, 171-175.
- BURT S. A.; REINDERS R. D. (2003).** Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Lett. Appl. Microbiol.* 36(3),162-7.
- BREUKINK E.; VAN KRAAIJ C.; VAN DALEN A.; DEMEL RA.; SIEZEN R.J.; DE KRUIJFF B.; KUIPERS O.P. (1998).** The orientation of nisin in membranes. *Biochem.* 36, 8153-8162.
- BERDY J. (2005).** Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot.* 58,1-26.
- BOUKSAIM M.; FISS I.; MEGHROUS J.; LACROIX C.; SIMARD R.E. (1998).** Immunodot detection of nisin Z in milk and whey using enhanced chemiluminescence. *J. Appl. Microbiol.* 84, 176-184.

BAKKALI F.; AVERBECK S.; AVERBECK D.; IDAOMAR M. (2008). Biological effects of essential oils – A Review. *Food and Chem Toxicol.* 46 (2), 446-475.

Butaye P.; Cloeckart A.; Schwarz S. (2003). Mobile genes coding for efflux mediated antimicrobial resistance in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Int J of Anti Agents.* 22, 205-210.

BANI JABER A. ; MCGUIRE J. ; AYRES J.W. ; DAESCHEL M.A. (2000). Efficacy of the antimicrobial peptide Nisin in emulsifying oil in water. 65 (3), 502-506.

BRUNETON J. (2009). Pharmacognosie, 4e édition, Edition Lavoisier.

BOUKHATEM M.N.; HAMAIDI M.S.; SAIDI F.; HAKIM (2010). Extraction, composition et propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle du Géranium Rosat (*Pelargonium graveolens* L.) cultivé dans la plaine de Mitidja (Algérie). *Revue « Nature et Technologie »*. n° 03.

CHOUITAH O.; MEDDAH B.; AOUS A.; SONNET P. (2013). Chemical composition and antimicrobial activities of the essential oil of wild Algerian *Marrubium Vulgare* L. *world J of pharma research.* 2, 909-916.

Croteau R. (1977). Site of monoterpene biosynthesis in *Majorana hortensis* leaves. *Plant Physiol.* 59, 519-520.

CRISTINA T. ; DE LIMA GRISI S. ; GORLACH-LIRA K. (2005). Action of nisin and high pH on growth of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* sp. in pure culture and in the meat of land crab (*Ucides cordatus*), *Bra J of Micro.* 36, 151-156.

CROTEAU R. ; HOOPER C. L. (1978). Metabolism of monoterpenes: Acetylation of menthol by a soluble enzyme preparation from pepper mint (*Mentha piperita*) leaves. *Plant Physiol.* 61, 737-742.

CARON M. (2001). Le jardin d'agrément arbustes et fleurs. Edition Ouest-France. Guide pratique .Allemagne, P280.

COSENTINO S.; TUBEROSO C. I. G.(1999). In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. *Lett. Appl. Microbiol.* 29(2),130-5.

CHENG S. S. ; LIU J. Y. ; TSAI K. H. ; CHEN W. J. ; CHANG S. T. (2004). Chemical composition and mosquito larvicidal activity of essential oils from leaves of different *Cinnamomum osmophloeum* provenances. *J of Agri and Food Chem.* 52, 4395–4400.

CHAO L. K. ; HUA K. F. ; HSU, H. Y. ; CHENG S. S. ; LIU, J. Y. ; CHANG, S. T. (2005). Study on the anti-inflammatory activity of essential oil from leaves of *Cinnamomum osmophloeum*. *J of Agri and Food Chem.* 53, 7274–7278.

CANDAN F.;UNLU M. T. B.; DAFERERA D.; POLISSIOU M.; SÖKMEN A.; AKPULAT A. (2003). Antioxidant and antimicrobial activity of essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). *J of Ethnopharma.* 87, 215–220.

CARMEN G.; HANCU G. (2014). Antimicrobial and antifungal activity of *Pelargonium roseum* Essential Oils. *Adv Pharm Bull*, 4(Suppl 2), 511-514.

DORMAN H. J. D. ; DEANS S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88(2), 308-16.

DEGRYSE A.C. ; DELPLA I. ; VOINIER M.A. (2008). Risques et bénéfices possibles des huiles essentielles. Atelier Santé Environnement. Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique (EHESP).

DAI J.; ZHU L.; YANG L.; QIU J. (2013). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil from *Wedelia prostrata*. *Exp and Clin Sci Int Online J.* 12, 479-490.

DERWICH E.; BENZIANE Z.; BOUKIR A. (2009). GC/MS Analysis of Volatile Constituents and Antibacterial Activity of the essential oil of Leaves of *Eucalyptus globulus* in Atlas Median from Morocco. *Ad in Nat and Appl Sciences.* 3(3), 305-313.

DRIESSEN A.J.M.; VAN DEN HOOVEN H.W.; KUIPER W.; VAN DE KAMP M.; SAHL H.G.; KONINGS R.N.H.; KONINGS W.N. (1995). Mechanistic studies of lantibiotic-induced permeabilization of phospholipid vesicles. *Biochemistry.* 34, 1606-1614.

DELARRAS C. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Edition TEC& DOC. Lavoisier.

DJAHOUDI A. (2015). Composition chimique et activité antibactérienne de l'huile essentielle de géranium rosat (*Pelargonium graveolens* L'Hér.) cultivé en Algérie. *Phytothérapie* DOI: 10. 1007/s10928-015-0950-2.

DJENANE D.; YANGUELA J.; AMROUCHE T.; BOUBRIT S., BOUSSAD S., RONCALES P. (2011). Chemical composition and antimicrobial effects of essential oils of *Eucalyptus globulus*, *Myrtus communis* and *Satureja hortensis* against *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* in minced beef. *Food sci. Technol. Int.* 17, 505-515.

DELAQUIS P.J.; STANICK K.; GIRARD B.; MAZZA G. (2002). Antimicrobial activity of individual and mixed fraction of Dill, Cilantro, Coriander and Eucalyptus Essential oils. *Int J of Food Micro.* 74, 101-109.

ELMOUALDI L. ; LABIOUI H. ; BOUSHAMA L. ; BENZAKOUR A. ; OUHSSINE M. ; EL YACHIOUI M. (2008). Activité bactéricide d'une souche de *Lactococcus lactis* subsp. Cremoris. *Bull. Soc.Pharm.Bordeau.*147, 7-18.

EFSA (2006). Avis du groupe scientifique sur les additifs alimentaires, les arômes, les auxiliaires technologiques et les matériaux en contact avec les aliments à la demande de la commission concernant l'utilisation de la nisine (E 234) en tant qu'additif alimentaire. Question numéro EFSA-Q-2005-031.

EL KALAMOUNI C.; RAYNAUD C.; TALOU T. (2009). Screening of antioxidant and antimicrobial activities of Midi-pyrénées aromatic plants. *Cheminetechnologia.* 3(52).

FRANCHOMME P. ; PENOEL D. (1990), Matière médicale aromatique fondamentale (317-406), livre quatrième, l'aromathérapie exactement, encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. *R.Jallois Edit.*, Limoge, 446p.

FADLI M. ; SAADA A. ; SAYADI S. ; CHEVALIERC J. ; MEZRIOUI N.E. ; PAGESC J.M. ; HASSANI L. (2012). Antibacterial Activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* essential oils against nosocomial infection bacteria and their synergistic potential with antibiotics. *Phytomedicine*. 19, 464-47.

FAUCON.M. (2009). Aromathérapie, pratique et usuelle. Edition Sang de la Terre, paris.

FEKIH N. (2015). propriétés chimiques et biologiques des huiles essentielles de trois espèces du genre *pinus* poussant en Algérie. Mémoire de doctorat es-sciences en chimie. Université de Tlemcen, Algérie.

FARAH A.; SATRANI B.; FECHTAL M.; ABDELAZIZ CHAOUCH A.; TALBI M. (2001). Composition chimique et activités antibactérienne et antifongique des huiles essentielles extraites des feuilles d'*Eucalyptus camaldulensis* et de son hybride naturel (clone 583). *Acta Botanica Gallica*. 148 (3), 183-190.

GUBA R. (2001). Toxicity mythus essential oils and their carcinogenic potential. *Int J of aroma*.11, 76-83.

GUINOISEAU E. (2010). Molécules antimicrobiennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action. Thèse de doctorat à l'université de corse.

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.

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. *Eu J of Clin Pharma*. 62, 373-379.

GHANNADI A.; BAGHERINEJA D .; ABEDI D.; JALALI M.; ABSALAN .; SADEGHI N.(2012). Antibacterial activity and composition of essential oils from *Pelargonium graveolens* L'Her and *Vitex agnus-castus* L. *Iranian J of Micro*. 4 ,171-176.

GILLES M.; ZHAO J.; AN M.; AGBOOLA S. (2009). Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian *Eucalyptus* species. *Food chem*.119, 731-737.

GUL F.; SHINWARI Z.; IMRAN A. (2012). Screening of indigenous knowledge of herbal remedies for skin diseases among local communities of north western Punjab, Pakistan. *Pakistan J of Bot*. 44(5), 1609-1616.

HART.T.; SHEARS.P.(1997). Atlas de poche de microbiologie. Medicine science Flammarion. 1996 Times Mirror International Publishers Limited. Iere edition, 1997.

HASPER H.E.; DE KRUIJFF B.; BREUKINK E. (2004). Assembly and stability of nisin-lipid II pores. *Biochemistry*. 43, 11567-11575.

- HINDI N.K.K. (2013).** *In-vitro* Antibacterial Activity of aquatic Garlic Extract, Apple vinegar and Apple vinegar-Garlic Extract combinaison. *A J of Phyto and Cli Thera.* 2321-2748.
- HAMMER K.A.; CARSON C.F.; RILEY T.V. (1999).** In vitro Susceptibilities of lactobacilli and Organisms Associated with Bacterial Vaginosis to *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil. *Antim Agents and Chemo.* 43 (1), 196-196.
- HURST A. (1981).** Nisin. *Ad in Appli Microbio.* 27, 85–123.
- HARLANDER S. K. (1993).** Regulatory aspect of bacteriocin use. In bacteriocins of lactic acid bacteria. Ed. D.G Hoover & L.R. Steenson, Academic Press, London. England, 233-248.
- INOUYE S.; ABE S.; REPO T. (2003).** Comparative study of antimicrobial and cytotoxic effects of selected essential oils by gaseous and solution contacts. *Int J of Aromatherapy.* 13, 33 – 41.
- INOUYE S. ; ABE S.(2007).** Nouvelle approche de l’aromathérapie anti-infectieuse. *Phytothérapie.* 1, 2 - 4.
- JASNIEWSKI J. (2008).** Etude des mécanismes d’action de bactériocines. Thèse de Doctorat à l’institut national polytechnique de LORRAINE. Université NANCY, Ecole Nationale Supérieure d’Agronomie et des Industries Alimentaires.
- JACQUES G. PALTZ S.A.(1997).** Le fascinant pouvoir des huiles essentielles. *Fascicule du laboratoire “Jacque Paltz”.*
- JULIANO R.L. ; Ling V.A. (1976).** Surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Bioch Biophy Acta.* 455, 152-162.
- KALEMBA D.; KUNICKA A. (2003)** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* 10: 813-829.
- KURKIN V.A.(2003).** Phenylpropanoids from medicinal plants. Distribution, classification, structural analysis and biological activity. *Chem. Nat. Compd.* 39,123-153.
- KLAENHAMMER T .R. (1993).** Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie,* 70, 337-349.
- KHADDOR M.; TANTAOUI-ELARAKI A. ; BENHADJIBA A. ; LAMARTI A.; EZZIYYANI M.; CANDELA CASTILLO M.E.; BADOUC A.(2003).** Destruction de l’aflatoxine par les bacteries lactiques du “LBEN” marocain et du yaourt. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux.* 142,101-112.
- KÖNIG W.A. (2001).** Hochmuth D.H., Joulain D., Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils. Library of MassFinder 2.1 University of Hamburg, Institute of Organic Chemistry, Hamburg,.

- KALPNA R.; CHANDA S. (2012).** *In-vitro* interaction of certain antimicrobial agents in combination with plant extracts against some pathogenic bacterial strains. *Asian pacific J of Trop Biomed.* 1466-1470.
- KUNLE O. ; OKOGUM J.(2003).** Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from *Lippa multiflora* leaf extract. *phytotherapy.* 10, 59-61.
- KATO T.; LIJIMA H.; ISHIHARA K.; KANEK T.; HIRAI K.; NAITO Y.; OKUDA K. (1990).** Antibacterial effect of listerine on oral bacteria. *Bull. Tokyo. Dent. Coll.* 31(4) , 301-307.
- LUCCHESI M.E.; CHEMAT F.; SMADJA J. (2004).** Solvent free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: Comparison with conventional hydro-distillation. *J. Chromatogr. A* 1043, 323-327.
- LUCCHESI M.E.; SMADJA J.; BRADSHAW S.; LOUW W.; CHEMAT F.(2007).** Solvent free microwave extraction of *Elletaria cardamomum* L: A multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil. *J. Food Eng.* 79,1079-1086.
- LIS-BALCHIN M.;BUCHBAUER G.; HIRTENLEHNER T. ; RESCH M. (1998)** antimicrobial Activity of Pelargonium essential oils added to a quiche filling as a model food system. *Lett. Appl. Microbiol.* 27(4),207-210.
- LACHOWICZ K.J.; JONES G.P.; BRIGGS D.R.; BIENVENU F.E.; WAN J.; WILCOCK A. ; COVENTRY M.J. (1998).** The synergistic preservative effects of the essential oils of sweet basil (*Ocimum basilicum* L) against acid-tolerant food microflora. *Lett Appl Microbiol.* 26(3), 209-214.
- LECLERC H. ; GAILLARD J. ; SIMONET M. (1995).**Microbiologie générale : la bactérie et le monde bactérien. Doinéditeurs-paris. 535.
- LOUCIF K. (2011).** Recherche de substances antibactériennes à partir d'une collection de souches d'actinomycètes. Caractérisation préliminaire de molécules bioactives. Université Mentouri Constantine Algérie.
- LIMA L.M. ; BABAKHANI B. ; BOLDAJI S.A.H. ; ASADI M.; BOLDAJI R.M. (2013).** Essential oils composition and antibacterial activities of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. *Int J of Medi and Arom Plants.*3, 214-219.
- LEVY S.B.; MC MURRY L.(1978).** Plasmid-determined tetracycline resistance involves new transport systems for tetracycline. *Nature.* 276, 90-92.
- LI T. ; TAO J. ; HONG F. (2005).** Study on The Inhibition Effect of Nisin, *The J of Amer Science.* 1,333-335.
- LIU W.; HANSEN J.N. (1990).** Some chemical and physical properties of nisin, a small protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Appli and envi Micro.*56 (8), 2551-8.
- MENGAL P.; BEH D.; BELLIDO G.M.; MONPON B. (1993).** VHMD: Extraction d'huile essentielle par micro-ondes. *Parfums Cosmétiques Arômes.* 114, 66-67.

MAY J.; CHAN C.H.; KING A.; WILLIAMS L.; FRENCH G.L. (2000). Time-kill studies of tea tree oils on clinical isolates. *J. Antim. Chemo.* 45, 639-643.

MARKHAM P.N.; NEYFAKH A.A. (2001). Efflux-mediated drug resistance in Gram-positive bacteria. *Cu Op Microb.* 5, 509-514.

MUTHU C. ; AYYANAR M. ; RAJA N. ; IGNACIMUTHU S. (2006). Medicinal plants used by traditional healers in Kancheepuram District of Tamil Nadu. *India. J of Ethno and Ethnomedicine.* 2-43.

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 à l'université de M'hamed Bougara, Boumerdes.

MANAHAR V.; INGRAM C.; GRAY G.; TALPUR N A.; ECHARD B.W.; BAGCHI D. PREUSS H.G. (2011). Antifungal activities of *origanium* oil against *candida albicans*. *Mol and cell biochem.* 228 , 111-117.

MALLEA M.; SOLER M. ; ANFOSSO F. ; CHARPIN J. (1979). Activité antifongique d'essences aromatiques. *Pathol. Biol.*, 27: 597-602.

MODZELEWSKA A. ; SUR S. ; KUMAR K.S. ; KHAN S.R.(2005). Sesquiterpenes: Natural products that decrease cancer growth. *Curr. Med.Chem.- Anti-cancer Agents.* 5,477-499.

MARUZZELLA J.C. (1962). The germicidal properties of perfume oils perfumery chemicals. *Am. Perfum. Cosmet.* 77(1), 67-72.

MADHYASTA M.S ; BHAT R.V (1984). *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production on black and white pepper and the inhibitory action of their chemical constituents. *Appl. Envi. Microbiol.* 48, 376-379.

MULDERS JWM., BOERRIGTER IJ., ROLLEMA HS., SIEZEN RJ., DE VOS WM. (1991). Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. *Eur. J. Biochem.* 201, 581-584.

MOLL G. N.; KONINGS W. N. (1999). Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 76, 185- 198.

MONTVILLE T.J.; BRUNO MEC. (1994). Evidence that dissipation of proton motive force is a common mechanism of action for bacteriocins and other antimicrobial proteins. *Int. J. Food Microbiol.* 24, 53-74.

MAXIA A.; SANNA C.; FRAU M. A.; PIRAS A.; KARCHULI M. S.; KASTURE V. (2011). Anti-inflammatory activity of *Pistacia lentiscus* essential oil: involvement of IL-6 and TNF- α . *SciFinder.*

MANSOUR M.; LINDER M.; MILLIERE J.B.; LEFEBVRE G. (1998). Combined effects of nisin, lactic acid and potassium sorbate on *Bacillus licheniformis* spores in milk. *Lait.* 7,117-128.

MACHEIX J.J.; FLEURIET A.; JAY-ALLEMAND C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. PPUR Presses Polytechniques et Universitaires. Romandes. Lausanne. 145.

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.

NAIT ACHOUR K. (2012). Etude de la composition chimique des essences de quatre espèces d'Eucalyptus poussant dans la région de Tizi-Ouzou. Thèse de Magistère. Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou ,Algérie.

NIKAIDO H. (2009). Multidrug resistance in bacteria. *Annu. Rev. Biochem.*78, 119-146.

OUSSOU K.R; COFFI K; NATHALI G ; SERIYOLOU ; GERARD K; MIREILLE D; YAO T.N; GILLES F. ; JEAN- CLAUDE C.H. (2004). Activités antibactériennes des huiles essentielles de trois plantes aromatiques de Cote-d'Ivoire. *Comptes rendus de chimie*.7,1081-1086.

O.M.S (2002). Organisation Mondiale de la santé (OMS) Rapport sur la médecine traditionnelle : besoins et potentiel. n° 4. 6 p.

PIBIRI M.C. (2005). Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de doctorat. Ecole polytechnique fédérale de Lausanne. (Suisse).

PONCE A.G.; FRITZ R. ; DEL VALLE C. ; CARLOS CAVALEIRO. ; LIGIA SALGUEIRO. (2009). Antifungal activity of essential oils on the native microflora of organic swiss chard. *Leben-Wissen and tech.* 36,679-684.

PRESCOTT H.; KLEIN WILEY J.M. ; SHERWOOD L.M. ; WOOLVERTON C.J. (2010). Microbiologie. De boeck.,Bruxelles. 849-856.

POOLE K. (2004). Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Cli Micro and Inf.* 10, 12-26.

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

QUALE, J.S.; BRATU J.; GUPTA; D. LANDMAN. (2006). Interplay of efflux system, ampC, and oprD expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Anti Agents Chemother.* 50,1633-41.

RICHARD H. (1992). Épices et Aromates. Technologie et Documentation Lavoisier. Paris. 339 p.

ROULIER G. (1992) . Les huiles essentielles pour votre santé. Traité pratique d'aromathérapie : propriétés et indications thérapeutiques des essences de plantes. Edt.

Dangles. France.

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. *J. Anti. Chemo.* 61, 1240-1243.

ROLLEMA H.S.; KUIPERS O.P.; BOTH P.; DE VOS WM.; SIEZEN R.J. (1995). Improvement of solubility and stability of the antimicrobial peptide nisin by protein engineering. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2873-2878.

RUHR E.; SAHL H.G.(1985). Mode of action of the peptide antibiotic nisin and influence on the membrane potential of whole cells and on cytoplasmic and artificial membrane vesicles. *Antimicrob. Agents Chemother.* 27, 841-845.

REISINGER P.; SEIDEL H.; TSCHESCHE H.; HAMMES WP. (1980). The effect of nisin on murein synthesis. *Arch. Microbiol.* 127, 187-193.

RAMTIN M. ; ALIREZA M. ; KHOSHKHOLGH-PAHLAVIANI M. ; ISSAZADEH K. ; ASSMAR M. ; ZARRABI S. (2013). In-vitro Antimicrobial Activity of *Iris pseudacorus* and *Urtica dioica*. *Zahedan J of Res in Med Sciences.*

SHARMA R.; SHARMA C.L.; KAPOOR B. (2005). Antibacterial resistance: current problems and possible solutions. *Indian J Med Sci.* 59, 120-129.

SHIRNER M.(2004). Huiles essentielles. Description et utilisation de plus de 200 huiles essentielles et huiles végétales. Gy Trédaniel Editeur.

SANGWAN N. S.; FAROOQI A. H. A.; SHABIH F.; SANGWAN R. S. (2001). Regulation of essential oil production in plants. *Plant Gro Reg.* 34, 3-21.

SHIN S.; KIM J.H. (2005). In vitro inhibitory activities of essential oils from two Korean thymus species against antibiotic-resistant pathogens. *Arch. Pharm. Res.* 28, 897-901.

SATRANI B. ; GHANMI M. ; FARAH A. ; AAFI A. ; FOUGRACH H. ; BOURKHISS B. ; BOUSTA D.; TALBI M.(2007). Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Cladanthus mixtus*. *Bull.Soc.Pharm.Bordeaux.* 146, 85-96.

SCHWARTZ R., DAVIS R.; HILTON T.J.(1992). Effect of temporary cements on the bond strength of resin cement. *Am. J. Dent.* 5(3) , 147-150.

SIVROPOULOU A. ; PAPANIKOLAOU E. ; NIKOLAOU, KOKKINI S. ; LANARAS T. ; ARSENAKIS M. (1996). Antimicrobial and cytotoxic activities of *origanum* essential oils. *J. Agric. Food.* 44, 1202-1205.

SIANI A.C. ; RAMOS M.F.S. ; O. 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*. *J of Ethnoph.* 66(1), 57-69.

SEBTI I. (2002). Bio-emballage actif incorporant la nisine, diffusion de cette bactériocine en gel d'agarose. Thèse de doctorat de l'Ecole Doctorale des Sciences de Vivant, Géosciences et Sciences de l'Environnement. Spécialité : Sciences des Aliments. N° d'ordre : 2558.

SAHL H.G.; BIERBAUM G. (1998). Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from Gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Micro.* 52, 41-79.

SELADJI D. (2014). Compositions chimiques, propriétés antimicrobiennes et antioxydantes des huiles essentielles des racines de trois *pinaceae* d'Algérie. Mémoire de Master en Chimie. Université de Tlemcen, Algérie.

SATTANNI L.; PALAZZOLO E.; GUARRASI V.; ALEO A.; MAMMINA C.; MOSCHETTI G.; GERMANA M.A. (2012). Inhibition of foodborne pathogen bacteria by essential oils extracted from citrus fruits cultivated in Sicily. *Food control.* 26, 326-330.

SEWANU S. (2012). The chemical composition, antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils of *Tulbaghiaviolacea* Harv and *Eucalyptus grandis* W.Hill ex Maiden. Thèse de magister de l'Université Zuland, KwaDlangezwa, Sud d'Afrique.

TAYLOR LY.; CENN D.D.; WELCH BI. (1990). Antimicrobial properties of nisin in fresh fish package in an atmosphere of carbon dioxide. *J. Food Prot.* 53, 953-957.

TEISSEIRE P.J. (1991). Chimie des substances odorantes. Tec et Doc., Lavoisier, Paris, France. 480p

TOHIDPOUR A.; SATTARI M.; OMIDBAIGI R.; YADEGAR A.; NAZEMI J. (2010). Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Phytomedicine.* 17, 142-145.

TUNELI A.; DELVES-BROUGHTON J. (1998). International acceptance of nisin as a food preservative. *Int. Dairy. Fed. Bull.* 329, 20-23.

TORTORA G. J.; FUNKE BERDELL R.; CASE CHRISTINE L. (2011). Introduction à La Microbiologie. ERPI Sciences, 2^{ème} édition., Pearson., Québec. 420-428.

VALNET J. (1974). Phytothérapie et aromatothérapie : nouvelles observations. *Plantes Méd et phyto.* 8, 229-236.

VARGAS I.; SANZ I.; PRIMA-YUFERA E. 1999 – Antimicrobial and Antioxidant compounds in the nonvolatile fraction of expressed range essential oil. *J. Food Prot.* 62(8): 929-932.

VAN DEN HOOVEN H.W.; SPONK CAEM.; VAN DE CAMP M. ; KONINGS RNH.; HILBERS CW.; VAN DEN VEN F.J.M. (1996). Surface location and orientation of the lantibiotic nisin bound to membrane-mimicking micelles of dodecyl phosphocholine and of sodium dodecylsulphate. *Eur. J. Biochem.* 235, 394-403.

VASCONCELOS SILVA M.G.; CRAVEIRO A.A.; ABREU MATOS F.J.; MACHADO M.L.L. ; ALENCAR J.W. (1999). Chemical variation during daytime of constituents of the essential oil of *Ocimum gratissimum*. *Fitoterapia.* 70, 32-34.

WILLEY J.M.; SHERWOOD L.M.; WOOLVERTON C.J. (2008). Microbiology. 7th Ed, McGraw Hill, New York. 852.

WENQTANG G.; SHUFEN L.; RUIXIANG Y.; SHAOKUN T.; CAN Q. (2007). Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. *Food chem.* 1001, 1558-1564.

WALSH S. E.; MAILLARD J.Y. (2003). Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and -negative bacteria. *J. Appl. Micro.* 94(2), 240-7.

YAGUPSKY P. (2006). Selection of antibiotic-resistant pathogens in the community. *The Ped Inf Diseases J.* 25, 974-976.

ZHIRI A. ;BAUDOUX D. (2006). Huiles essentielles chémotypées et leurs synergies: aromathérapie scientifique. Luxembourg : Edition Inspir Development.

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

ZAHER Z.; SUBER K.; KHUMAN P.; AJINKYA K.; SHEKHAR L. (2010). Antimicrobial activity of essential oil of flowers of *plumeriaalbalinn* (Apocynaceae). *Int j of pharmacy and pharma sciences.* 0975-1491.

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

ANONYME1 :

<http://www.aujardin.info/plantes/pelargoniumgraveolens.php#vD4VLoSCV5mFOs9c.99>

Annexe 1 : Composition des solutions et milieux de culture utilisés

- **Eau physiologique stérile**

Composition en g/l :

Chlorure de sodium (NaCl)..... 9g

Eau distillée.....1000ml

pH=7

Stérilisation à 121°C/15min.

- **Gélose Mueller Hinton (MH)**

Composition en g/l

Extrait de viande.....3g

Hydrolysate de caséine.....17,5g

Agar.....18g

pH=7,4

Stérilisation à 120°C/15 min

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

Composition en g/ml

Protéase-peptone.....10g

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

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

Phosphate disodique.....2,5g

Eau distillée.....1000ml

pH=7,4

Stérilisation à 120°C/15 min

- **Gélose nutritive (GN)**

Composition en g/l

Peptone.....	10g
Extrait de viande.....	3g
Extrait de levure.....	3g
Chlorure de sodium.....	5g
Agar.....	18g

pH=7,2±0,2

Stérilisation à 120°C/15 min

- **Gélose Chapman**

Composition en g/l

Extrait de viande.....	1g
Extrait de levure.....	3g
Tryptone.....	5 g
Peptone bactériologique.....	10g
Mannitol.....	10g
Rouge de phénol.....	0,025g
Agar.....	15g

pH=7,4

Stérilisation à 120°C/15 min

- **Gélose Hecktöen**

Composition en g/l

Peptone pepsique de viande.....	15 g
Extrait de viande.....	3g
Extrait de levure.....	3 g

Lactose.....	12g
Salicine.....	2g
Saccharose.....	12g
Chlorure de sodum.....	5g
Thiosulfate de sodum.....	5g
Citrate de fer ammoniacal.....	1,5g
Sels biliaires.....	4g
Bleu de bromothymol.....	0,064g
Fuschine acide.....	0,1g

pH=7,4

Stérilisation à 120°C/ 15 min

- **Gélose King A**

Composition en g/l

Peptone de viande.....	20g
Glycérol (Glycérine).....	10ml
Potassum sulfate.....	1,5g
Agar.....	20g

pH=7,2

Stérilisation à 120°C/15 min

- **GéloseKingB**

Composition en g/l

Protéose-peptone.....	20g
Glycérol.....	10ml
Phosohatedipotassique.....	1,5g
Sulfate de magnesium.....	1,5g

Agar.....15g

pH=7,2

Stérilisation à 120°C/20min.

Annexe 2 : Résultats des tests statistiques

Tableau 1 : Table de l'ANOVA pour les résultats de l'analyse de la variance de la sensibilité des six bactéries vis-à-vis des deux H.Es et la nisine

Effet	Tests Univariés de Significativité pour P.sylvestris P.asperum Nisine (Feuille de données1) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse				
	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	7564,500	1	7564,500	111,0385	0,000000
Souche	778,500	5	155,700	2,2855	0,111784
Erreur	817,500	12	68,125		

Tableau 2 : Table de l'ANOVA pour les résultats de l'analyse de la variance de l'activité exercée par les deux huiles essentielles et la nisine sur les souches étudiées

Effet	Tests Univariés de Significativité pour Activité antibacterienne (Feuille de données1) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse				
	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	7564,500	1	7564,500	72,69286	0,000000
HEs ou Nisine	35,083	2	17,542	0,16857	0,846450
Erreur	1560,917	15	104,061		

Tableau 3 : Table de l'ANOVA pour l'analyse de la variance de la sensibilité des bactéries vis-à-vis des trois combinaisons de *Pinus sylvestris*-nisine

Effet	Tests Univariés de Significativité pour Combinaison P.sylvestris Nisine (Feuille de données1) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse				
	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	2738,000	1	2738,000	138,2440	0,000000
Souche	401,833	5	80,367	4,0578	0,021771
Erreur	237,667	12	19,806		

Tableau 4 : Table de Newman Keuls pour l'analyse de la variance de la sensibilité des bactéries vis-à-vis des trois combinaisons de *Pinus sylvestris*-nisine

		Test de Newman-Keuls ; variable Combinaison P.sylvestris nisine (Feuille de données2) Probabilités Approximatives des Tests Post Hoc Erreur : MC Inter = 19,806, dl = 12,000					
Cellule N°	Souche	{1} 15,833	{2} 6,0000	{3} 19,333	{4} 15,167	{5} 9,0000	{6} 8,6667
1	S ATCC		0,111560	0,354636	0,857625	0,186702	0,251210
2	S	0,111560		0,029720	0,106518	0,695009	0,477300
3	E ATCC	0,354636	0,029720		0,505437	0,062081	0,076513
4	E	0,857625	0,106518	0,505437		0,115588	0,214823
5	K	0,186702	0,695009	0,062081	0,115588		0,928539
6	P	0,251210	0,477300	0,076513	0,214823	0,928539	

Tableau 5 : Table de l'ANOVA pour les résultats l'analyse de la variance de l'activité des trois combinaisons (*Pinus sylvestris*-nisine) sur les bactéries étudiées

		Tests Univariés de Significativité pour Combinaison P.sylvestris Nisine (Feuille de Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse				
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p	
ord. origine	2738,000	1	2738,000	67,94981	0,000001	
Concentration des combinaisons	35,083	2	17,542	0,43534	0,654967	
Erreur	604,417	15	40,294			

Tableau 6 : Table de l'ANOVA pour l'analyse de la variance de la sensibilité des bactéries vis-à-vis des trois combinaisons de *Pelargonium asperum*-nisine

		Tests Univariés de Significativité pour Combinaison P.asperum Nisine (Feuille de données Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse				
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p	
ord. origine	9361,681	1	9361,681	159,3101	0,000000	
Souche	5300,403	5	1060,081	18,0397	0,000033	
Erreur	705,167	12	58,764			

Tableau 7 : Table de Newman Keuls pour l'analyse de la variance de la sensibilité des bactéries vis-à-vis des trois combinaisons de *Pelargonium asperum*-nisine

		Test de Newman-Keuls ; variable Combinaison P.asperum Nisine (Feuille de données) Probabilités Approximatives des Tests Post Hoc Erreur : MC Inter = 58,764, dl = 12,000					
Cellule N°	Souche	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
		17,000	9,6667	17,000	18,167	14,333	60,667
1	S ATCC		0,654959	1,000000	0,855364	0,905645	0,000225
2	S	0,654959		0,491368	0,663257	0,470453	0,000178
3	E ATCC	1,000000	0,491368		0,981147	0,677760	0,000261
4	E	0,855364	0,663257	0,981147		0,926238	0,000184
5	K	0,905645	0,470453	0,677760	0,926238		0,000204
6	P	0,000225	0,000178	0,000261	0,000184	0,000204	

Tableau 8 : Table de l'ANOVA pour les résultats l'analyse de la variance de l'activité des trois combinaisons (*Pelargonium asperum*-nisine) sur les bactéries étudiées

		Tests Univariés de Significativité pour Combinaison P.asperum Nis Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse				
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p	
ord. origine	9361,681	1	9361,681	24,40144	0,000178	
Concentration des combinaisons	250,778	2	125,389	0,32683	0,726216	
Erreur	5754,792	15	383,653			

Résumé

Les résultats de notre étude ont révélé l'activité antibactérienne la plus élevée de l'huile essentielle de *Pinus sylvestris* vis-à-vis des bactéries *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Escherichia coli* et *Pelargonium asperum* vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300), *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*.

L'étude de l'activité antibactérienne de la nisine en association avec de l'HCL à 0,02N à témoigné un effet inhibiteur sur les six souches bactériennes testées.

D'après les combinaisons réalisées entre les deux H.Es et la nisine, un effet indifférent est obtenu vis-à-vis de *Klebsiella pneumoniae* avec (25 % H.E *Pinus sylvestris* et 75% nisine), un effet additif vis-à-vis de *Escherichia coli* (ATCC25922) avec (50 % H.E *Pelargonium asperum* et 50 % nisine). Par contre, nous avons enregistré une synergie vis-à-vis de *Klebsiella pneumoniae* avec (75 % H.E *Pelargonium asperum* et 25% nisine) et vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* avec les trois combinaisons testées.

L'utilisation des huiles essentielles en combinaison avec d'autres produits microbiens efficace comme la nisine peu représenté une alternative aux antibiotiques.

Mots clés : Huile essentielle, *Pinus sylvestris*, *Pelargonium asperum*, nisine, activité antibactérienne, synergie.

Abstract

The results of our study showed the highest antibacterial activity of essential oil of *Pinus sylvestris* against the bacteria *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (ATCC25922) and *Escherichia coli* and *Pelargonium asperum* E.O against *Staphylococcus aureus* (ATCC43300), *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

The study of the antibacterial activity of nisin in combination with the HCL to 0.02 N testified to an inhibitory effect on the six bacterial strains tested.

According to the combination between the two essential oils and nisin, an indifferent effect is achieved against *Klebsiella pneumonia* with (75% of *Pinus sylvestris* E.O and 25% of nisin), an additive effect against *Escherichia coli* (ATCC25922) with (50% of *Pelargonium asperum* E.O and 50% of nisin). But a synergetic effect was recorded against *Klebsiella pneumoniae* with (75 % of *Pelargonium asperum* E.O and 25% of nisin) and against *Pseudomonas aeruginosa* with the three combinations tested.

The use of essential oils in combination with other effective microbial products such as nisin could be represents an alternative to antibiotics.

Keywords: Essential oil, *Pinus sylvestris*, *Pelargonium asperum*, nisin, antibacterial activity, synergy.