

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou

ⵔⵉⵣⵓⵣ ⵓⵎⵓⵝⵓⵎⵎⵉⵔ ⵓⵏ ⵉⵏⵙⵉⵎⵉⵏⵜ ⵓⵏ ⵉⵏⵙⵉⵎⵉⵏⵜ ⵓⵏ ⵉⵏⵙⵉⵎⵉⵏⵜ



Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques

Département de Microbiologie et Biochimie

MEMOIRE

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master Académique

Filière: Biotechnologie

Spécialité: Biotechnologie Microbienne

**Evaluation de l'activité antibactérienne de
l'huile essentielle de *Cedrus atlantica* et son
potentiel synergique avec la nisine.**

Présenté par: M^{lle} AZZAZ Saida.

M^{lle} DEHBI Thiziri.

Soutenu publiquement le: 11 / 07 / 2019

Devant le jury composé de:

M^r TAZDAIT D.

MCA UMMTO

Président du jury

M^r OUELHADJ A.

MCA UMMTO

Promoteur

M^{me} BEN AZZOUZ K.

MAA UMMTO

Examinatrice

Année universitaire: 2018-2019




Remerciements

Nous tenons à remercier tout d'abord le Dieu tout puissant qui nous a procuré du courage et de la volonté pour avoir terminé ce travail.

Nous tenons à remercier notre promoteur M^r: OUELHADJ A. pour ses conseils, son soutien et son encadrement afin de réaliser ce travail.

Nos remerciements vont également aux membres du jury: Mr: TAZDAIT D. d'avoir accepté de présider le jury et M^{me}: BEN AZZOUZ K. d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Nos sincères remerciements sont adressés à tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.



Dédicaces

Avec l'aide de DIEU, tout puissant qui m'a donné le courage et la volonté pour achever ce modeste travail que je dédie :

A ceux qui ont donné un sens pour mon existence, à ceux qui ont été toujours un synonyme de sacrifices, confiance, d'aide et compréhension, à la lumière de mes yeux, « YEMMA et VAVA ».

Là où je suis arrivée aujourd'hui, c'est à vous mes chers parents que je le dois, que DIEU vous garde.

A ma chère sœur Nawel, a son mari Hafid et leur petit ange Mazigh.

A mes chers frères : Toufik, Sofiane et Walid.

A ma grande mère Yamina.

A tous les membres de ma famille AZZAZ, En témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je porte pour vous, je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, santé et de réussite.

A mon binôme, Thiziri et sa famille.

Je tiens à te remercier pour ton soutien permanent et te souhaiter une vie pleine de santé et de bonheur.

A ma chère : Sabrina

A mes adorables amies : Karima, Rosa, Meriem, Lydia, Sarah, Houda, Manel et Celia.

Un grand merci pour votre soutien, vos encouragements, votre aide. Avec toute mon affection et estime je vous souhaite beaucoup de réussite et de bonheur, autant dans votre vie professionnelle que privée.

Je n'oublierai pas de remercier vivement les enseignants qui ont assuré ma formation du niveau primaire jusqu'au niveau universitaire.

A tout ceux que j'aime et ceux qui m'aiment.

SAIDA

Dédicaces

Je dédie ce modeste mémoire...

A la mémoire de mon défunt Père HOCINE

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour lui.

A ma très chère mère: SADIA que Dieu la garde

Rien au monde ne vaut les efforts fournis par elle jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.

A mes frères : SMAIL, AHCENE, AMAR et ACHOUR.

A mes chères sœurs : KAHINA, FETTA, SAMIRA, KARIMA et leurs maris.

A mes adorables neveux et nièces.

A mon binôme SAIDA, à qui je souhaite une vie pleine de réussites.

A tous mes amis et camarade en particulier REZIKA, BELYNDA, KAHINA et INES.

Et enfin, à tous ceux qui me sont chers.

THIZIRI

ABTS	Acide 2,2'-bis 3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique.
ADI	Average Daily Intake.
ADN	Acide Désoxyribonucléique.
AFNOR	Association Française de Normalisation.
ARN	Acide Ribo Nucléique.
ATB	Antibiotique.
ATCC	American Type Culture Collection
BHIB	Brain Heart Infusion Broth.
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice.
Da	Dalton.
DMSO	Dimethylsulfoxyde.
DO	Densité Optique.
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl.
EDTA	Acide Ethylénediaminetétraacétique.
FAO	Food and Agriculture Organisation (Organisation pour l'Alimentation et l'Agriculture)
FDA	Food and Drug Administration (Agence Américaine des Produits Alimentaires et Médicamenteux).
FRAP	Fluorescence Recovery After Photobleaching.
GN	Gélose Nutritive.
GRAS	Generally Recognizer As Safe.
Hcl	Acide Chlorohydrique.
HE (s)	Huile(s) Essentielle(s)
KDa	Kilo Dalton.
LPS	Lipopolysaccharide.
MH	Muller Hinton.
NRDC	National Research Development corporation (Société National de développement et de recherche).
OMS	Organisation Mondiale de la Santé (World Health Organization)
pH	Potentiel Hydrogène.
SARM	Staphylocoque Doré Résistant à la Mériciline.

UFC Unité Formant Colonie.

Figure 1	Structure d'isoprène.	6
Figure 2	Entrainement à la vapeur d'eau ascendante et descendante.	13
Figure 3	Arbre du cèdre de l'atlas.	18
Figure 4	Parties botaniques de <i>Cedrus atlantica</i> Manetti.	19
Figure 5	Structure de la nisine.	22
Figure 6	Schéma de biosynthèse, de régulation et d'immunité de la souche productrice de la nisine.	23
Figure 7	Principe de la méthode de diffusion par disques.	32
Figure 8	Méthode de détermination de la CMI en milieu liquide.	35
Figure 9	Méthode de la détermination de la CMB en milieu solide.	37
Figure 10	Résultats des témoins négatifs réalisés avec DMSO sur les bactéries testées.	40
Figure 11	Résultats des témoins négatifs réalisés avec HCL sur les bactéries testées.	40
Figure 12	Résultats des témoins positifs réalisés avec des disques d'antibiotiques sur les six souches.	41
Figure 13	Effet de l'HE de <i>Cedrus atlantica</i> sur les six souches bactériennes testées.	43
Figure 14	Effet de l'HE de la nisine sur les six souches bactériennes testées.	46
Figure 15	Effet de la combinaison de l'HE et la nisine à différentes concentrations sur <i>Bacillus cereus</i> .	50
Figure 16:	Effet de la combinaison de l'HE et la nisine à différentes concentrations sur <i>Escherichia coli</i> .	50

Figure 17:	Effet de la combinaison de l'HE et la nisine à différentes concentrations sur <i>klebsiella pneumoniae</i> .	51
Figure 18:	Effet de la combinaison de l'HE et la nisine à différentes concentrations sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	51
Figure 19:	Effet de la combinaison de l'HE et la nisine à différentes concentrations sur <i>Staphylococcus aureus</i> MV50.	52
Figure 20:	Effet de la combinaison de l'HE et la nisine à différentes concentrations sur <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.	52
Figure 21:	Séries de dilutions réalisées afin de déterminer la CMI en milieu liquide de l'HE de <i>Cedrus atlantica</i> sur la souche <i>Bacillus cereus</i> .	56
Figure 22:	Séries de dilutions réalisées afin de déterminer la CMI en milieu liquide de l'HE de <i>Cedrus atlantica</i> sur la souche <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.	57
Figure 23:	Résultats de la CMB aux concentrations de 31,69µl/ml et 15,84µl/ml sur <i>Bacillus cereus</i> .	58
Figure 24:	Résultats de la CMB aux concentrations de 7,92µl/ml et 3,16µl/ml sur <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.	59

Tableau I	Appareils utilisés.	27
Tableau II	Tableau descriptif des différentes souches bactériennes testées.	28
Tableau III	Tableau descriptif des milieux de culture utilisés.	28
Tableau IV	Les antibiotiques utilisés et leur valeur de diamètre critique	29
Tableau V	Description de l'HE utilisée.	29
Tableau VI	Les dilutions utilisées pour déterminer les CMI.	36
Tableau VII	Les caractères morphologiques des souches bactériennes testées.	39
Tableau VIII	Résultats des diamètres des zones d'inhibition (en mm) des antibiotiques sur les souches bactériennes testées.	42
Tableau IX	Résultats des diamètres d'inhibition en mm (moyennes \pm écart types) de l'activité antimicrobienne de <i>Cedrus atlantica</i> sur les six souches bactériennes testées.	43
Tableau X	Résultats des diamètres d'inhibition en mm (moyennes \pm écart types) et la sensibilité des souches bactériennes testées vis-à-vis de la nisine.	47
Tableau XI	Tableau récapitulatif des résultats de la combinaison entre la nisine et l'huile essentielle à trois concentrations différentes sur les six bactéries testées.	53

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des Tableaux

Introduction..... 1

Partie I: Revue bibliographique

Chapitre I: Généralités sur les huiles essentielles.

1. Définition.....	3
2. Localisation des huiles essentielles dans la plante	3
3. Propriétés physico-chimiques.....	4
4. Facteurs de variabilité de la composition des huiles essentielles	4
4.1. Facteurs intrinsèques.....	5
4.2. Facteurs extrinsèques	5
5. Composition chimique	5
5.1. Série terpénique	5
5.1.1. Monoterpènes	6
5.1.2. Sesquiterpènes	6
5.1.3. Diterpènes	6
5.2. Série aromatique	6
6. Rôle des huiles essentielles dans la plante.....	7
7. Activités biologiques des huiles essentielles.....	7

7.1. Activité antimicrobienne	7
A. Activité antibactérienne	8
B. Activité antifongique	9
7.2. Activité antioxydante	10
7.3. Activité anti-tumorale	10
8. Domaines d'utilisation des huiles essentielles	11
8.1. Aromathérapie	11
8.2. Cosmétologie et parfumerie	12
8.3. Pharmacologie	12
8.4. Industrie agro-alimentaire	13
9. Méthodes d'extraction des huiles essentielles	13
9.1. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau	13
9.2. Extraction par L'hydrodiffusion	14
9.3. Extraction par Hydrodistillation	14
9.4. Extraction au CO ₂ supercritique	14
9.5. Extraction par solvants organiques	14
10. Toxicité des huiles essentielles	15
11. Mode de stockage	15

Chapitre II : Description de *Cedrus atlantica*

1. Présentation de <i>Cedrus atlantica</i>	17
1.1. Classification botanique	18

1.2. Caractéristiques botaniques	18
1.3. L'huile essentielles de <i>Cedrus atlantica</i> et ses composants majeurs	19
1.4. Propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle de cèdre d'atlas.....	20
1.5. Utilisations de l'huile essentielle de cèdre d'Atlas	20

Chapitre III : Généralités sur la nisine

1. La nisine	21
1.1. Structure et propriétés physico-chimiques	21
1.2. Biosynthèse de la nisine	22
1.3. Spectre d'activité	24
1.4. Mode d'action.....	25
1.5. Toxicité de la nisine	25
1.6. Rôle de la nisine dans la conservation des aliments	26

Partie II : Etude expérimentale

Chapitre I : Matériel et méthodes

I. Matériel	27
1. Appareillage.....	27
2. Les souches bactériennes testées	27
3. Les milieux de culture utilisés	28
4. Les antibiotiques utilisés	29
5. L'huile essentielle testée	29
6. La bacteriocine utilisée	30

II. Méthodes	30
1. Revivification microbiologique des souches microbiennes	30
2. Vérification de la pureté des souches bactériennes	30
2.1.Repiquage sur les milieux sélectifs	30
2.2.Examens microscopiques.....	30
3. Etude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de <i>Cedrus atlantica</i> et celle de la Nisine.....	31
3.1.Pré-enrichissement des souches bactériennes	31
3.2.Préparation des suspensions bactériennes	31
3.3.Evaluation de l'activité antibactérienne in vitro de l'huile essentielle de <i>Cedrus atlantica</i>	32
3.4.Evaluation de l'activité antibactérienne in vitro de la nisine	34
3.5.Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de l'huile de cèdre.....	34
3.6.Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) de l'huile de cèdre.....	36
4. Etude de l'effet de combinaison de l'huile essentielle avec la nisine	38
4.1. Test de sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis de la combinaison de l'huile essentielle de cèdre et la nisine	38

Chapitre II : Résultats et discussion

1. Résultats des tests de vérification des souches bactériennes	39
2. Résultats des témoins réalisés par la méthode de diffusion sur gélose	39
2.1.Résultats des témoins négatifs réalisés avec le DMSO et l'HCL.....	39

Table des matières

2.2.Résultats des témoins positifs	41
3. Résultats du test de sensibilité à l'huile essentielle testée	43
4. Résultats du test de sensibilité à la nisine	46
5. Résultats du test de l'effet antibactérien de la combinaison (huile essentielle et la nisine) à différentes concentrations sur les souches bactériennes testées	50
6. Résultats de la concentration minimale inhibitrice	56
7. Résultats de la concentration minimale bactéricide	58
Conclusion et perspectives.....	61
Références bibliographiques	63
Annexes.	

Introduction

Depuis longtemps, les plantes aromatiques et médicinales sont utilisées largement dans la plupart des civilisations, à des fins religieuses, cosmétiques, culinaires et médicales.

Les bactéries, en devenant insensibles à tout traitement, limitent une gamme d'antibiotiques en thérapeutique médicales causant ainsi une prolongation de l'état pathologique et un accroissement du taux de mortalité. C'est pourquoi, la découverte de nouveaux agents antibactériens est devenue plus qu'indispensable.

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), près de 80 % des populations dépendent de la médecine traditionnelle pour des soins de santé primaire. Par conséquent, le dépistage des constituants bioactifs des espèces végétales est plus que jamais d'actualité (Ouelhadj et *al.*, 2017).

Actuellement, le secteur des huiles essentielles (HEs) extraites des plantes aromatiques, grâce à leur pouvoir antimicrobien (effet bactéricide et bactériostatique), a bénéficié d'une croissance rapide, soutenue par l'étendue et la diversité des secteurs d'application de ces extraits naturels.

En plus des HEs, il existe des métabolites bioactifs d'origine bactérien « les bactériocine », ces dernières ont un large spectre d'inhibition incluant des microorganismes d'altération et pathogènes. Ceci a suscité l'intérêt des chercheurs et les a incités à l'utiliser comme bio-conservateurs dans le domaine agroalimentaire et comme nouvel agent antimicrobien dans la médecine.

Comme beaucoup des huiles essentielles, l'HE de *Cedrus atlantica* a été investiguée pour ses propriétés antibactériennes, antifongiques et anti-inflammatoires (Derwich et *al.*, 2010).

Dans ce contexte, cette présente étude a pour objectif d'évaluer *in vitro* l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Cedrus atlantica*, celle de la nisine, et leurs combinaisons pour un éventuel effet synergique vis à-vis de différentes souches bactériennes de références. Cette étude est structurée de trois parties:

- ✓ La première partie, une revue bibliographique qui donne un aperçu général sur les huiles essentielles, une description de l'espèce végétale utilisée: *Cedrus atlantica* et des notions sur la nisine.

- ✓ La deuxième partie présentera la partie pratique dans laquelle nous présenterons le matériel utilisé pour notre étude et le mode opératoire suivi pour:
 - Le test antibactérien de l'huile essentielle de *Cedrus atlantica* et la nisine seules et en combinaison vis-à-vis de six souches bactériennes à Gram positif et négatif.
 - La détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) en milieu liquide et la CMB.
- ✓ La dernière partie présentera les résultats obtenus des tests effectués avec une analyse à la lumière de la littérature scientifique disponible. L'étude est clôturée par une conclusion et des perspectives.

Partie I

Revue bibliographique

Chapitre I

Généralités sur les huiles essentielles

1. Définition

Les huiles essentielles, HEs, (ou parfois «essences végétales», sont un mélange de composés lipophiles, volatiles et souvent liquide, synthétisés et stockés dans certains tissus végétaux spécialisés. Extraites de la plante grâce à des procédés physiques tels que l'hydrodistillation, l'entraînement à la vapeur ou par expression à froid dans le cas des agrumes, elles sont responsables de l'odeur caractéristique de la plante (Bruneton, 1993 ; AFNOR, 2000).

Le terme «HUILE» se rapportant à leurs caractères hydrophobes et visqueux, tandis que le terme « essence » est utilisé pour désigner les molécules odoriférantes contenues dans la plante et aussi le caractère inflammable. Quant au terme «essentiels» se comprenant comme étant la caractéristique principale et typique de la fragrance de ces substances (Boukhobza et Goetz, 2014).

Contrairement à ce que le terme pourrait laisser penser, les huiles essentielles ne contiennent pas de corps gras comme les huiles végétales obtenues avec des pressoirs (huile de tournesol, ...etc.) (Anton et Lobstein, 2005).

2. Localisation des huiles essentielles dans la plante

Elles sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices et s'accumulent en général dans des cellules glandulaires spécialisées. Ensuite, elles sont stockées dans des cellules dites cellules à HEs (*Lauraceae*), dans des poils sécréteurs (*Lamiaceae*), dans des poches sécrétrices (*Myrtaceae*), dans des canaux sécréteurs (*Astraceae*).

Selon Oussala et *al.*, (2006), elles peuvent être stockées dans divers organes végétaux: les fleurs (bergamotier, rose,...) les feuilles (citronnelle, eucalyptus,...), les racines (vétiver), les rhizomes (curcuma, gingembre,...), les fruits (anis, badiane,...), le bois (bois de rose, santal,...), ou graines (muscade,...). Si tous les organes d'une même espèce peuvent renfermer une huile essentielle, la composition de cette dernière peut varier selon sa localisation (Belkou et *al.*, 2005).

Sur le site de stockage, les gouttelettes d'huile essentielle sont entourées de membranes spéciales. En raison de leur caractère lipophile et donc de leur perméabilité extrêmement réduite vis-à-vis des gaz, ces membranes limitent l'évaporation des HEs ainsi que leur oxydation à l'air (Bruneton, 1993 ; Anton et Lobstein, 2005).

3. Propriétés physico-chimiques

Les propriétés physico-chimiques des HEs dépendent de plusieurs facteurs d'après Bardeau (2009), comme par exemple, les conditions environnementales et climatiques, la saison de la cueillette des plantes, les conditions de stockage, la méthode utilisée pour leur extraction et les conditions d'analyses employées pour l'identification des constituants de ces huiles. Elles forment un groupe très homogène (Bernard et *al.*, 1988 ; Bruneton, 1993). Les principales caractéristiques sont:

- ❖ Liquides à température ambiante.
- ❖ N'ont pas le toucher gras et onctueux des huiles fixes.
- ❖ Volatiles et très rarement colorées.
- ❖ Une densité faible pour les huiles essentielles à forte teneur en monoterpènes.
- ❖ Un indice de réfraction variant essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés.
- ❖ Solubles dans les alcools à titre alcoométrique élevé et dans la plupart des solvants organiques mais peu solubles dans l'eau.
- ❖ Douées d'un pouvoir rotatoire puisqu'elles sont formées principalement de composés asymétriques.
- ❖ Très altérables, sensibles à l'oxydation et ont tendance à se polymériser donnant lieu à la formation de produits résineux, il convient alors de les conserver à l'abri de la lumière et de l'air.

4. Facteurs de variabilité de la composition des huiles essentielles

Etant formées de mélanges généralement complexes, les huiles essentielles présentent une très grande variabilité, tant au niveau de leur composition, qu'au plan du rendement des plantes d'origines. Cette variabilité peut s'expliquer par différents facteurs, que nous pouvons regrouper en deux catégories:

4.1. Facteurs intrinsèques

Liés à l'espèce, au type de clone, à l'organe concerné, à l'interaction avec l'environnement (type de sol ou climat, ...etc.) et au degré de maturité du végétal concerné, voir au moment de la récolte au cours de la journée.

Les travaux de Maffei et Sacco (1997), ont montrés des différences de composition des huiles essentielles en raison d'organes différents (feuilles et fleurs) et de sous-espèces différentes. Ainsi les huiles essentielles extraites à partir des baies et des feuilles de piment ne sont pas identiques.

Le rendement et la composition de l'huile essentielle des plantes de *Lavandula* obtenues par clonage sont déterminés par le stade végétatif au moment de la récolte (Fantino, 1990).

4.2. Facteurs extrinsèques

En lien avec la méthode d'extraction (Besombe, 2008). Huang et *al.* (1995) ont montré l'influence des méthodes d'extraction sur la composition des huiles essentielles.

D'après Carette (2000), les huiles essentielles se conservent entre 12 et 18 mois après leur obtention, car, avec le temps, leurs propriétés tendent à décroître.

Par ailleurs, d'autres travaux ont mis en évidence l'influence de l'origine géographique de la matière première (Verzele et *al.*, 1988).

5. Composition chimique

D'après Belaiche (1979), les huiles essentielles sont constituées de variables molécules chimiquement différentes qui appartiennent, de façon quasi exclusive, à deux groupes: le groupe de terpénoïdes et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane. On retrouve des composés minoritaires et un certain nombre de constituants sous forme de traces à côté des composés majoritaires (entre 2 et 6 généralement) (Pibiri, 2006).

5.1. Série terpénique

Dès 1887, les terpènes ont été reconnus par Wallach comme étant des hydrocarbures naturels, de structure cyclique ou de chaîne ouverte, qui se caractérisent par la présence dans

leur squelette d'unité isoprénique à 5 atomes de carbone C₅H₈ (Figure 1). On trouve: les Monoterpène, les sesquiterpènes et les diterpènes en fonction du nombre d'unités d'isoprène (Ochoa, 2005).

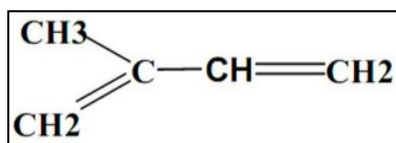


Fig.1: Structure de l'isoprène (Guignard, 2000).

5.1.1. Monoterpènes

Les molécules monoterpéniques ont de faibles poids moléculaire et s'évaporent rapidement. (Bruneton, 1993 ; Buckle, 1997). Ce sont des molécules formées de deux isoprènes (C₁₀H₁₆), peuvent être acycliques (Myrcènes), monocycliques (α et β terpène) ou bicycliques (sabinène), peuvent constituer plus de 90% de l'huile essentielle (Harkati, 2011), parmi les plantes contenant ces composés on trouve la menthe, le romarin et les agrumes (citron, orange) (Girard, 2010).

5.1.2. Sesquiterpènes

Le nombre de molécules sesquiterpéniques connues n'a cessé de croître, depuis l'isolement du cadinène et du caryophyllène par Wallach à la fin du XIX^e siècle. Il s'agit de la classe la plus diversifiée des terpènes (Bretmaier, 2006). Constituée de 15 atomes de carbone souvent présentés sous forme de lactones qui peuvent se transformer en carbures plus en moins insaturés (Wicht et Anton, 2003; Winks, 2003).

5.1.3. Diterpènes

Les diterpènes sont des molécules à 20 atomes de carbone (Rodney *et al.*, 2000; Oswald, 2006).

5.2.Série aromatique

Contrairement aux précédents, les composés aromatiques sont moins fréquents dans les HEs (Bekhechi et Abdoulouahid, 2010). Ils sont généralement responsables des caractères organoleptiques des huiles essentielles. Nous pouvons citer en exemple l'eugénol qui est responsable de l'odeur du clou de girofle (Teisseire, 1991).

Parmi les composés aromatiques les plus répons dans l'huile essentielle, nous citons:

- ❖ Les aldéhydes cinnamiques, cuminiques et anisiques.
- ❖ Des phénols et éthers (thymol, carvacrol, eugénol) (Bekhechi et Abdoulouahid, 2010).

6. Rôle des huiles essentielles dans la plante

La fonction biologique des terpénoïdes des huiles essentielles est écologique et constitue une réponse à ses stress biotiques et abiotiques (Bruneton, 1997). Ces métabolites secondaires jouent un rôle fondamental de protection et de défense antimicrobienne des plantes (Tajkarimi et *al.*, 2010). Ils participent dans les interactions entre la plante et son environnement, aussi bien dans le domaine des interactions végétales (inhibiteurs de la germination), que dans celui des interactions végétal-animal: protection contre les prédateurs, insectes, champignons et attraction des pollinisateurs (Picherski et Gershenzon, 2002); Unsicker et *al.*, 2009).

7. Activités biologiques des huiles essentielles

Grâce à leurs nombreuses applications thérapeutiques rapportées dans plusieurs travaux de recherche scientifiques, Les huiles essentielles comptent parmi les plus importants principes actifs des plantes (Bruneton, 1999).

La valeur des activités biologiques des HEs tient à son «totum»; c'est-à-dire, l'intégralité de ses constituants et non seulement à ses composés majoritaires (Amarti et *al.*, 2010; Laib, 2011 ; Lahlou, 2004).

Elles sont connues pour leurs effets antimicrobiens et antiseptiques, notamment des propriétés antitoxiques et plus récemment anticancéreuses (Valnet, 2005). Par ailleurs, ces activités sont variables d'une HE à l'autre (Ouis, 2015).

7.1. Activité antimicrobienne

L'exploration des huiles essentielles pour la recherche de molécules à activité antimicrobienne semble être une voie intéressante, vu qu'elles sont principalement utilisées en médecine traditionnelle, pour leurs propriétés antimicrobiennes (Rios et *al.*, 2005). Un produit

naturel a une activité « antimicrobienne » lorsqu'il inhibe la croissance des micro-organismes pour des CMI comprises entre 100 µg/mL et 1000 µg/ml (Tergos et *al.*, 2002).

Les différentes méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne, ainsi que les différents facteurs influençant celle-ci ont été décrites par Kalemba et Kunicka (2003). L'inhibition de la croissance des microorganismes est variable en fonction de la méthode utilisée, des conditions de culture, et de la solubilité des agents de dispersion ou diffusion des huiles essentielles dans le milieu nutritif (Kalemba et Kunicka, 2003).

Cette activité peut probablement ne pas être attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire, du fait de la variabilité des quantités et des profils des composants des HEs (Carson et *al.*, 2002). En effet, elles peuvent avoir une activité bactéricide ou une inhibition de la croissance. Le plus souvent l'action des HEs est assimilée à un effet bactériostatique. Cependant certains de leurs constituants chimiques semblent avoir des propriétés bactéricides (Zhiri, 2006).

A. Activité antibactérienne

Le mauvais usage des antibiotiques conduit à l'apparition de germes pathogènes résistants, sur lesquels les antibiotiques ne sont pas efficaces. Il est donc important de trouver une alternative à leur utilisation. Des études ont montrées que les HEs permettent de constituer une candidature particulière crédible. En effet, La mise en évidence de l'action antibactérienne des huiles essentielles a été réalisée par Delacroix en 1881 (Boyle, 1955).

Tohidpour et *al.*, (2010), ont rapporté l'effet antibactérien des huiles essentielles de *Thymus vulgaris* L. (*Lamiaceae*), *Eucalyptus globulus* Labill. (*Myrtaceae*) sur les Staphylocoque Doré Résistant à la Mériciline (SARM) avec des concentrations minimales inhibitrices estimées à 18,5 µg/mL et 85,6 µg/mL, respectivement. Kirmizibekmez et *al.*, (2009), ont montré la sensibilité des SARM vis-à-vis de l'action de l'huile essentielle de *Lavandula stoechas* L. sp *stoechas* (CMI= 31,2 µg/mL).

Les HEs agissent aussi bien sur les bactéries Gram positif que sur les bactéries Gram négatif. Toutefois, les bactéries Gram négatif sont moins sensibles et ceci est directement lié à la structure de leur paroi cellulaire (Burt, 2004). En effet, Le lipopolysaccaride (LPS) de la paroi des bactéries Gram négatif leur confère un caractère hydrophile qui rend leur membrane externe imperméable à la plupart des constituants hydrophobes des HEs (Saei-Dehkordi et *al.*,

2010). Ces dernières peuvent altérer directement la membrane cellulaire des bactéries Gram positif, induisant la rupture de celle-ci, le blocage enzymatique et la perturbation de la perméabilité membranaire (Sandri et *al.*, 2007).

A titre d'exemple, Carson a démontré que l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* Cheel (*Myrtaceae*) serait capable de modifier la perméabilité de la membrane plasmique de *Staphylococcus aureus*, entraînant une perte des ions potassium. L'observation au microscope électronique de l'action du terpinène-4-ol sur les cellules bactériennes, a montré la formation de structures mésosomes. Ce qui a été également formé après traitement à la vancomycine (Carson et *al.*, 2002).

Les HEs peuvent aussi inhiber la synthèse de l'ADN, ARN, des protéines et des polysaccharides (Cox et *al.*, 1991).

B. Activité antifongique

Les sécrétions végétales tel que les HEs apparaissent intéressante pour leur pouvoir fongistatique (Giordani et Caloustian, 2006 ; Lis-Balchin, 2002). Selon Zhiri (2006), les groupes moléculaires avec les plus puissantes actions antibactériennes sont également des antifongiques efficaces mais ils doivent être utilisés sur de plus longues périodes.

Les différentes études sur l'effet des HEs sur les dermatophytes montrent qu'il n'existe pas de groupe chimique particulier responsable de celle-ci. Cependant, il semblerait que les phénylpropanoïdes (ex, estragole, eugénol) et les alcools sesquiterpéniques représentés par l' α -bisabolol présentent des propriétés antifongiques intéressantes. Par exemple, L'HE de *Plinia cerrocampaensis* Barrie contenant 42,8% d' α -bisabolol comme composé majoritaire, a montrée une meilleure inhibition de la croissance de *Trichophyton mentagrophytes* avec une CMI estimée à 32 $\mu\text{g/mL}$ (VILA et *al.*, 2010). Ce dermatophyte s'est montré sensible à l'action de l'HE de *Citrus macroptera* Montrouz, dont la composition chimique est dominée par le β -pinène (33,3%), α -pinène (25,3%) et le p-cymène (17,6%) avec une CMI évaluée à 12,5 $\mu\text{g/mL}$ (Waikedre et *al.*, 2010).

Selon les travaux de Sharma et Tripathi, (2006) et Viuda-Martos et *al.*, (2007), les huiles essentielles de citrus (orange douce, citron) montrent une activité antifongique contre *Aspergillus Niger* et *Aspergillus flavus*. Ces substances augmentent la perméabilité de la

membrane plasmique ce qui induit la rupture de celle-ci, entraînant ainsi la mort des levures (Cox et *al.*, 2000).

Selon Salhi (2015), la méthode de contact direct a permis de mettre en évidence le pouvoir antifongique de l'HE du *Laurus nobilis* vis-à-vis de la souche *Fusarium sporotrichioides*.

7.2. Activité antioxydante

L'auto-oxydation des lipides est un phénomène chimique très complexe. Elle est responsable de la formation de produits chimiques nuisibles à la santé humaine et animale (Avlessi et *al.*, 2004). D'après Belhadj et *al.*, (2010), de nouvelles sources végétales d'antioxydants naturels (carvacrol, eugénol, tochophérol...etc.) sont recherchées par les industriels après avoir mis en cause ceux de synthèse en raison de leurs risques toxicologiques potentiels.

D'après l'étude effectuée par De Oliveira et *al.*, (2018), Le composant principal de l'HE des fleurs de *T.minuta* cultivée dans le sud du Brésil est le (Z)-tagétone (1). Par une simple Michael-type reaction, le composé (1) a été converti en thiotagétone (6) avec un rendement de 82%. L'HE et les deux composés individuels 1 et 6 ont été testés pour leurs propriétés antioxydantes et antifongiques et il a été observé que l'HE est un puissant antioxydant *in vitro*, étant actif dans tous les tests effectués (DPPH, ABTS, FRAP, NO radical scavenging and lipid peroxidation). L'effet antioxydant de l'HE est principalement en raison du transfert d'électrons et est due non seulement à la présence de (Z)-tagétone (1), mais aussi en raison de la synergie entre les composants mineurs. La présence d'un thiophényle dans la tagétone (comme dans la thiotagétone (6)), augmente la capacité d'inhiber la peroxydation de lipide. De plus, une activité antifongique élevée de l'HE *T.minuta* contre *C.lipolytica*, *C. parapsilosis* et *T. asahii* a été observée, qui est comparable au fluoconazole.

7.3. Activité anti-tumorale

Au cours des dernières décennies, la thérapie anticancéreuse a connu un réel bouleversement et un foisonnement de découvertes fondamentales. Les huiles essentielles et leurs constituants ont montrés des activités anticancéreuses puissantes *in vitro* et *in vivo* (Bouyahya et *al.*, 2016).

Dans une étude récente, Nikolic et *al.*, (2014), ont montré l'activité cytotoxique des HEs de cinq espèces de la famille de *Lamiaceae* (*Mentha piperita*, *Mentha pulegium*, *Lavandula angustifolia*, *Satureja montana* et *Salvia lavandulifolia*) contre des lignées tumorales des cellules de carcinome (HeLa), Adenocarcinoma (A549) et de cellules fibroblastiques cancéreuses de fœtus humain (MRC-5). Cette activité cytotoxique est fortement liée à la présence des composés terpéniques et phénoliques bioactifs.

Un grand nombre d'études suggèrent que les constituants des HE, tels que le carvacrol, constituent une nouvelle classe de drogues anticancéreuses très frappantes dans la régression des tumeurs avec une toxicité limitée (Bouyahya et *al.*, 2016). L'étude de Atheer Abbas Yassen Al-Fatlawi sur l'activité antiproliférative et pro apoptotique du carvacrol sur des cellules cancéreuses humaines confirme l'effet positif du carvacrol sur les gènes régulateurs apoptotiques dans le col utérin et les cellules cancéreuses hépatique. Cette étude conclut que le carvacrol pourrait être un potentiel chimio thérapeutique contre le cancer, mais des recherches plus poussées sont nécessaires pour garantir les revendications thérapeutiques (Al-Faltawi, 2018).

8. Les domaines d'utilisation des huiles essentielles

Malgré que la thérapie tient toujours une large place dans l'utilisation des essences de plante, la vulgarisation de l'usage des huiles essentielles a également élargi le domaine des champs d'application. Par leurs nombreuses et diverses propriétés, les HEs sont devenues une matière d'importance économique considérables avec un marché en constante croissance.

En effet, elles sont commercialisées et présentent un grand intérêt dans divers secteurs industriels comme en pharmacie par leurs pouvoirs antiseptique, analgésique, antispasmodique, apéritif, antidiabétique...etc., en alimentation par leur activité antioxydante et leur effet aromatisant, en parfumerie et en cosmétique par leur propriétés odoriférantes (Ouis, 2015).

8.1. Aromathérapie

Ou la thérapie aromatique, a été décrite pour la première fois en 1928 par le scientifique français RENE-MAURICE GATTEFOSSE, elle correspond à l'utilisation des huiles essentielles à des fins thérapeutiques, donc une forme de médecine alternative. Ainsi

elles s'utilisent de plus en plus dans diverses spécialités médicales telles que: l'ostéopathie, la rhumatologie et aussi dans l'esthétique (Bruneton, 1993).

L'exemple le plus couramment utilisé est la listerine, inventée au XIX^{ème} siècle, comme un puissant antiseptique chirurgical utilisé également sous forme de bain de bouche pour le soin de santé bucco-dentaire (Fine, 2010). L'eugénol est utilisé en dentisterie pour ses propriétés antiseptiques et analgésiques (Cho et *al.*, 2008).

8.2. Cosmétologie et parfumerie

Les HEs représentent environ 60% des matières premières de l'industrie de parfums synthétiques, du parfumage des savons et des cosmétiques. Selon le National Research Développement Corporation (NRDC), leurs propriétés odoriférantes relaxantes confèrent à ces dernières une consommation importante en parfumerie et en cosmétique (Bouamer et *al.*, 2004 ; Bouanane et Boussehel, 2005). Il représente une grande part de la demande en substances naturelles en particulier celle de rose, de jasmin, de violette, de verveine...etc. (Bessah, 2015 ; Ouis, 2015).

La phytothérapie et l'aromathérapie (association de plantes et huiles essentielles) sont depuis toujours au cœur des formulations du laboratoire NUXE[®] ¹.

8.3. Pharmacologie

Les essences issues des plantes sont utilisés en grande partie dans la préparation d'infusion (menthe, verveine, thym,...etc.) et sous forme de préparation galénique. Plus de 40% de médicaments sont à base de composants actifs de plantes (Bruneton, 1993; Ouis, 2015). Par exemple, l'huile essentielle d'hélichryse et l'huile végétale de rose musquée font partie des traitements de choix dans l'arsenal thérapeutique post opératoire immédiat, et retardent des interventions de chirurgie esthétique et plastique en offrant une réelle efficacité, une bonne tolérance et une réduction des délais d'éviction sociale (Voinchet et Giraud-Robert, 2007).

¹ <https://www.nuxe.com/en>

8.4. Industrie agro-alimentaire

Une nouvelle technique pour réduire la prolifération des micro-organismes réside dans la conservation des denrées alimentaires et pour améliorer le goût ainsi que pour leur aromatisation (Rhayour, 2002; Benzeggouta, 2005; Benoit *et al.*, 2010).

Selon Ladaniya *et al.* (2008), Bousbia *et al.* (2009), Mebarki (2010), les HEs d'orange et de citron sont utilisées comme aromatisants dans beaucoup de produits alimentaires tels que les boissons alcooliques et non alcooliques, des produits de pâtisseries et de confiseries.

9. Méthodes d'extraction des huiles essentielles

Diverses méthodes sont mises en œuvres pour l'extraction des essences végétales. La sélection de la meilleure méthode se fait en fonction de la nature de la matière végétale à traiter, des caractéristiques physico-chimiques de l'essence à extraire, de l'usage de l'extrait et l'arôme du départ au cours de l'extraction (Lucchesi, 2005).

9.1. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau

La distillation à la vapeur d'eau, ou entraînement à la vapeur d'eau, est la technique la plus courante pour l'obtention des huiles essentielles. Elle est applicable en générale à toutes les essences qui ne sont pas sensiblement altérées par l'eau à 100°C (Lucchesi, 2005).

Dans cette technique, le matériel végétal est soumis à l'action d'un courant de vapeur sans macération préalable (Laib, 2011). La matière végétale est placée sur une grille perforée au-dessus de la base de l'alambic et n'est pas en contact avec l'eau. Les vapeurs saturées en composés volatils sont condensées sur une surface froide puis décantées (Fekih, 2014).

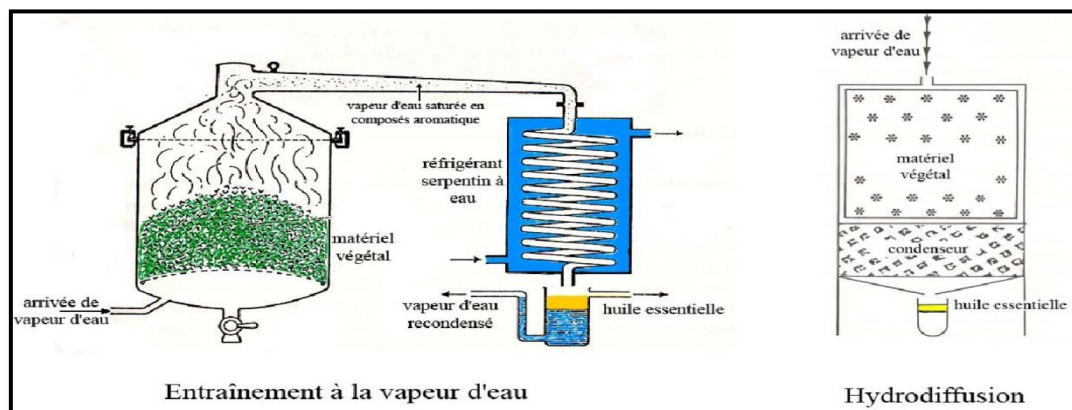


Fig.1: Entraînement à la vapeur d'eau ascendante et descendante (Lucchesi, 2005).

9.2. Extraction par L'hydrodiffusion

Contrairement aux techniques classiques de distillation dont le flux de vapeur est ascendant, dans cette technique le flux de vapeur traverse la biomasse végétale de manière descendante.

L'avantage de l'hydrodiffusion est traduit par l'amélioration qualitative et quantitative de l'huile récoltée, l'économie du temps, de vapeur et d'énergie (Lucchesi, 2005).

9.3. Extraction par Hydrodistillation

C'est la technique la plus utilisée pour l'extraction des huiles essentielles et de séparation à l'état pur, mais aussi d'obtenir un meilleur rendement (Bruneton, 1993). Le principe consiste à immerger directement la biomasse végétale dans l'alambic rempli d'eau, placé sur une source de chaleur qui est ensuite portée à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'HE sera alors séparée de l'eau par des procédés mécaniques (Dugo *et al.*, 2002 ; Attou, 2011).

9.4. Extraction au CO₂ supercritique

L'extraction par fluide à l'état supercritique consiste à remplacer le solvant par le CO₂ à l'état supercritique, le CO₂ n'est ni liquide, ni gazeux à une température supérieure à 31°C (Piochon, 2008 ; Sutour, 2010). Passant un courant du CO₂ à forte pression dans le végétale, fait éclater les poches à essences et entraîne les HEs qui seront ensuite récupérées (Machioni, 2003).

Dans le cas de dioxyde de carbone, les températures d'extraction sont basses et non agressives pour les constituants les plus fragiles, aussi bien que la possibilité d'éliminer et de recycler le solvant par simple compression détente. A ces différents avantages s'ajoutent ceux de l'innocuité, d'inertie et d'inflammabilité de CO₂ (Lagunez, 2006).

9.5. Extraction par solvants organiques

C'est la méthode la plus pratiquée, elle permet la séparation des huiles essentielles grâce à l'utilisation de solvant tel que l'hexane, le cyclohexane, l'éthanol moins fréquemment le dichlorométhane et l'acétone (Legrand, 1993 ; Dapkivicius *et al.*, 1998).

L'extraction se fait dans des appareils appelés extracteur de construction différente 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 (Brian, 1995).

Le coût élevé de l'équipement, ainsi que la réglementation liée à la protection de l'environnement limitent l'utilisation de cette méthode (Lagunez, 2006).

10. Toxicité des huiles essentielles

Les HEs sont des substances puissantes et très actives. Elles représentent une source inépuisable de remèdes naturels (Ouis, 2015). Elles contiennent des milliers de composants, elles sont très efficaces mais aussi très dangereuses. La toxicité provient de la présence de certaines molécules aromatiques pour lesquelles des risques ont été identifiés. Une famille biochimique particulière, celle des cétones, est ici particulièrement visée: elle présente une neurotoxicité et un risque abortif. La famille des phénols (la peau et le foie), les HEs contenant les furocoumarines et pyrocoumarines. Enfin, l'absorption orale d'huiles essentielles riches en monoterpènes (toutes les espèces de pins et de sapins, de genévriers et même le santal blanc) sur de longues périodes peut enflammer et détériorer à terme, les néphrons (Pinchuk *et al.*, 2012; Chaker, 2010).

Les huiles essentielles doivent être prises à bon escient et à doses adaptées afin d'éviter de dommageables effets secondaires, parce que l'efficacité et la toxicité ce n'est souvent qu'une question de quantité (Scimeca, 2007; Festy, 2011).

11. Mode de stockage

La relative instabilité des molécules constitutives des HEs implique des précautions particulières pour leur conservation. En effet, les possibilités de dégradation sont nombreuses, facilement objectivées par la mesure d'indices chimiques, par la détermination de grandeurs physiques et/ou par l'analyse chromatographique. Les conséquences sont multiples par exemple, photo-isomérisation, photocyclisation, coupure oxydative, peroxydation et décomposition en cétones et alcools, thermo-isomérisation, hydrolyse, transestérification. Ces

dégradations pouvant modifier les propriétés et/ou mettre en cause l'innocuité de l'huile essentielle, il convient de les éviter:

- ❖ Utilisation de flacons propres et secs en aluminium vernissés, en acier inoxydable ou en verre teinté anti-actinique, presque entièrement remplis et fermés de façon étanche.
- ❖ Stockage à l'abri de la chaleur et de la lumière.
- ❖ Dans certains cas, un antioxydant approprié peut être ajouté à l'huile essentielle. Par ailleurs, des incompatibilités sérieuses peuvent exister avec certains conditionnements en matières plastiques.

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

Chapitre II

Description de *Cedrus atlantica*

1. Présentation de *Cedrus atlantica*

Dans la famille des *abiétacées*, *Cedrus* est le genre le plus ancien après *Pinus* et son origine remonterait au Crétacés (Gaussen, 1964).

Le genre *Cedrus*, nom d'origine grec « kedros », est classé parmi les plantes à graines (spermatophytes) et plus précisément les plantes à ovules nues (gymnospermes). Il porte des cônes (*Coniferophyta*) constitués d'écaillés disposées en spirale (Emberger, 1998).

Cedrus est un genre ancien connu depuis le tertiaire avec une large répartition. La superficie occupée par le cèdre naturel se répartit en trois grandes zones, au Liban (160 000 ha), en Himalaya (500 000 ha), au Maroc et en Algérie (El Haib, 2011).

Selon leur répartition géographique différente, le cèdre est classé en quatre espèces différentes :

- Le cèdre de l'Atlas ou *Cedrus atlantica* Manetti
- Le cèdre du Liban ou *Cedrus libani* A. Rich.
- Le cèdre de Chypre ou *Cedrus brevifolia* Henry.
- Le cèdre de l'Himalaya ou *Cedrus deodara* G. Don.

Cedrus deodara est la plus répandue des espèces, elle peuple une partie de l'Inde, de l'Afghanistan et du Népal. Tandis que, la répartition de *Cedrus brevifolia* est plus confidentielle. En effet, elle ne couvre que quelques dizaines d'hectares dans l'île de Chypre. La première espèce est endémique des montagnes nord africaines, la seconde est présente en Asie mineure, au Liban et en Turquie (Toth, 2005).

➤ Le cèdre de l'atlas:

- Noms habituels: *Cedrus atlantica*
- Nom botanique: *Cedrus atlantica*.
- Nom local en arabe: Arz, Meddad.
- Nom local en berbère: Iddil, Ihguel.
- Nom en français: Cèdre d'atlas, Cèdre bleu, Cèdre argenté.

Le cèdre d'atlas est l'une des espèces les plus importantes économiquement et écologiquement de la montagne de méditerranée. C'est un arbre de grande taille pouvant

dépasser les 40 mètres de hauteur et il est capable de vivre plusieurs siècles dans des conditions favorables.

1.1. Classification botanique

Emberger (1960 in TALEB, 2004), attribue au genre *Cedrus* la systématique suivante:

- **Embranchement:** Spermaphytes
- **S/ Embranchement:** Gymnospermes
- **Classe:** Vectrices
- **Ordre:** Coniférales
- **S/Ordre:** Abiétale
- **Famille:** Pinacées
- **Genre:** *Cedrus*
- **Espèce:** *Cedrus atlantica* Manetti.



Fig.3: Arbre du cèdre de l'atlas (Ait Baziz et Chemali, 2017).

1.2. Caractéristiques botaniques

- L'arbre: pouvant atteindre 50m de haut à l'âge adulte dans les peuplements soit anciens en sol profond, soit serrés (Boudy, 1952)
- Le port: possède dans son jeune âge un port pyramidal, puis avec l'âge il s'étale, pour prendre une forme tubulaire, le fut du cèdre est rectiligne
- L'Ecorce: quant il est jeune l'écorce est lisse et brun, avec l'âge les écailles deviennent grises foncées, crevasses et sinueuses (Toth, 1980)
- Les feuilles: aiguilles persistantes 3-4 ans, aigues, assez rigides, 15 à 20 mm, leur couleur allant du vert clair foncé jusqu'au bleu (Boudy, 1952 ; Toth. 1980)
- Le Fruit: la maturité des cônes dure 2ans après la floraison, de couleur brune violacée, ils ont 5-8 cm de dimension, atteignent au plus 10 cm (Riou-Nivert, 2007 ; Toth, 1980)
- La graine: grosse, triangulaire, 10-15 mm, marron roux se termine par une large aile, très résineuse (Toth, 1980)
- Le système racinaire: est très développé, pivotant, les racines des plants d'une année sont comprises entre 14 et 20 cm (Toth, 1980).

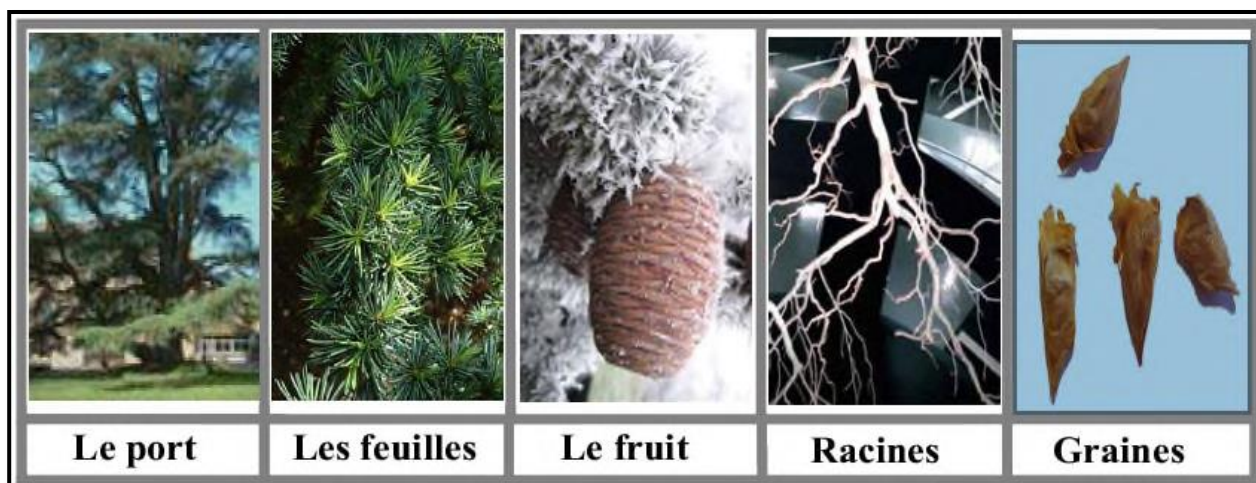


Fig.4: Parties botaniques de *Cedrus atlantica* Manetti (Kacher et Kadjar, 2018)

1.3. L'huile essentielles de *Cedrus atlantica* et ses composants majeurs

Les différentes parties des arbres de cèdre (bois, cônes, graines et résine) renferment des HEs qui diffèrent qualitativement et quantitativement. Certains composés restent propres au bois, d'autres au feuillage. Les HEs des rameaux et des aiguilles renferment cependant un mélange des composés du bois et du feuillage (Fidah, 2016).

L'HE de *Cedrus atlantica* est obtenue par hydrodistillation ou par entraînement à la vapeur de bois ou des aiguilles. Généralement, c'est le bois qui nous intéresse car les aiguilles offrent une huile essentielle proche au niveau chimique de celle des autres conifères.

Le bois de cèdre renferme entre 1,6 et 4 % d'HE (Aberchane et *al.*, 2004 et 2006). La composition biochimique est susceptible d'évoluer en fonction des conditions de production et de la qualité de l'huile.

Les principaux constituants de l'HE du bois de cèdre, son:

- Les himachalènes (53%) pour la partie hydrocarbures.
- Les atlantones (14%) pour la partie oxygénée.
- D'autres composés tels que le δ -cadinène, le cubénoïl, l'himachalol, le cédranoxyde et le Z- α -atlantone présentent également des teneurs non négligeables variant de 2 à 4% (Aberchane *et al.*, 2004).

1.4. Propriétés physico-chimique de l'huile essentielle de cèdre d'atlas*

- Couleur: jaune miel.
- Aspect: liquide limpide.
- Odeur: douce, boisée, avec une note légèrement acide.
- Conditions de conservation: dans un endroit sec, à l'abri de la chaleur et de la lumière.
- Densité de l'huile essentielle de cèdre d'atlas: 0,924 - 0,950.
- Point éclair (température à laquelle le produit devient inflammable): 93°C.

1.5. Utilisation de l'huile essentielle de cèdre d'Atlas

Les propriétés de l'huile essentielle de cèdre s'expliquent par la présence de composés actifs à l'origine présents dans le bois de *Cedrus atlantica*.

En raison de ses propriétés insecticides et de son caractère non toxique pour les mammifères, l'huile de la cédraie est utilisée à la place de la pyrèthrine contre les insectes domestiques (Sallé, 1991). L'huile essentielle de cèdre est également utilisée par les producteurs de savon de toilette et détergents (Schaffner, 1993) comme un fongicide efficace, non-phytotoxique car elle contrôle la détérioration fongique de certaines épices pendant leur stockage.

En outre, le constituant principal de l'huile de cèdre le β -himachalène diminue la sécrétion de médiateurs de l'inflammation.

Chapitre III

Généralités sur la nisine

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont des peptides antimicrobiens de faible poids moléculaire. Elles ont une activité inhibitrice dirigée contre les bactéries proches de la souche productrice.

La nisine est la seule bactériocine de bactéries lactiques, utilisée comme bio-ingrédient dans les aliments depuis 1988, Elle a été reconnue par son efficacité vis-à-vis les *listeria monocytogenes*. Son efficacité dépend de la qualité des aliments et est meilleure dans le cas où la charge des contaminants est faible. Sa première utilisation été dans un fromage de type Emmental pour empêcher le gonflement par *Clostridium butyricum*, et contre la contamination par *Clostridium botulinum* des fromages pasteurisés à pâte fondue (Sebti et *al.*, 2002).

1. La nisine

La nisine est un peptide de 3,5 KDa, constitué de 34 acides aminés, thermorésistants et actifs à des pH bas. Découverte par hasard en 1928 et en 1947, elle a été appelée « une substance inhibitrice du Groupe N (streptococcie) ». Sa structure a été élucidée en 1971 (Liu et Hansen, 1990).

En 1988, elle a été reconnue par la Food and Drug Administration (FDA) et est utilisée en tant qu'agent de conservation (E234) dans l'industrie alimentaire (Sebti et *al.*, 2002). Produite par des souches de *Lactococcus lactis* sub sp lactis, depuis d'autres variantes (A, Z, O, U et U2) ont été découvertes.

La nisine appartient à la classe I des bactériocines ou lanthionine qui regroupe les composés protéiques d'une taille inférieure à 5 kDa (Klaenhammer, 1993). (Lubelsky et *al.*, 2008 ; De Aruaz et *al.*, 2009). Le terme lantibiotique (par contraction des mots lanthionine et antibiotique) leur est généralement réservé (Sahl et *al.*, 1998).

1.1. Structure et propriétés physico-chimique

Via des réactions intermoléculaires entre les résidus didéshydroalanine (Dha) et didéshydrobutyrine (Dhb), Les molécules de nisine peuvent s'assembler en dimères ou en oligomères de 7000 à 14000 Da (Klaenhammer, 1993). La conformation en anneaux des lanthionines assurerait la rigidité du peptide, diminuerait sa sensibilité à la protéolyse et augmenterait sa résistance à la chaleur (Mc Auliffe et *al.*, 2001).

Il existe deux variantes naturelles de la nisine, soit la nisine A de 3353 Da et Z de 3330 Da, qui diffèrent par une substitution de l'histidine en position 27 dans la nisine A et par un résidu asparagine pour la nisine Z. Cette substitution confère à la nisine Z une capacité accrue de diffusion dans les milieux complexes (Meghroun *et al.*, 1997).

La solubilité de la nisine est en fonction du pH et de la force ionique de la solution (Rollema *et al.*, 1995).

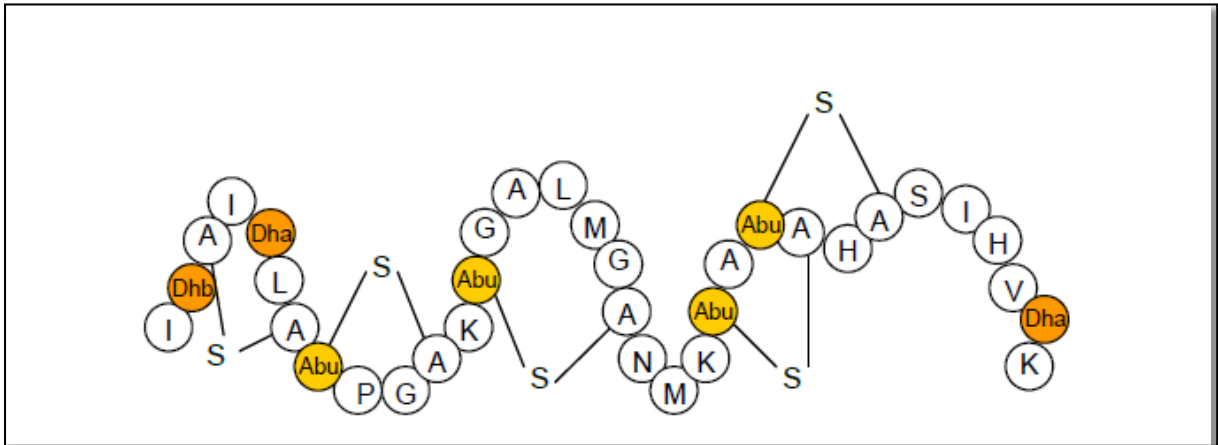


Fig.5 : Structure de la nisine (Makhloufi *et al.*, 2011).

1.2. Biosynthèse de la nisine

Contrairement aux antibiotiques ou aux toxines qui sont synthétisés par des cascades enzymatiques, Les bactériocines sont directement produites par la voie ribosomique, sous la forme de polypeptide ou de prépeptide (Jack *et al.*, 1995).

En générale, la biosynthèse de la nisine se déroule en 3 étapes (Benmouna, 2012):

- ✓ La formation des acides aminés inhabituels (des modifications post-traductionnelles).
- ✓ L'organisation en structure cyclique de la pré-nisine.
- ✓ Le clivage et le transport vers l'extérieur.

Les gènes impliqués dans la biosynthèse sont organisés en clusters dans le locus est symbolisé par "Lan" (Asaduzzman et Sonomot, 2009). Le système génétique «nis» impliqué dans la production de la nisine est retrouvé sur les éléments transposable présent sur le chromosome trois, classes de transposons responsables de la production de la nisine bien définit chez *Lactococcus Lactis ssp.* La biosynthèse de la nisine est influencée par

différents facteurs tels que la température de milieu, pH, et la salinité (MAKHLOUFI et *al.*, 2011).

Le gène de structure est appelé Nis, il code pour un peptide de 23 à 30 acides aminés qui sera clivé à l'extérieur de la cellule après avoir subi des modifications post-traductionnel formant des acides aminés inhabituels. Le transport de peptide est assuré par le gène de structure, qui sera clivé par une protéase NisP ou par le domaine protéasique du système transporteur ABC, le NisT (Mc Auliffe et *al.*, 2001).

Ce système se fait par «Quorum sensing», il possède une histidine Kinase NisK qui phosphoryle le régulateur de réponse NisR sous l'effet d'un stimulus extérieur. (Kleerbezem, 2004).

Les gènes NisI, NisF, NisE et NisG assurent l'immunité de la souche productrice. (Stein et *al.*, 2003).

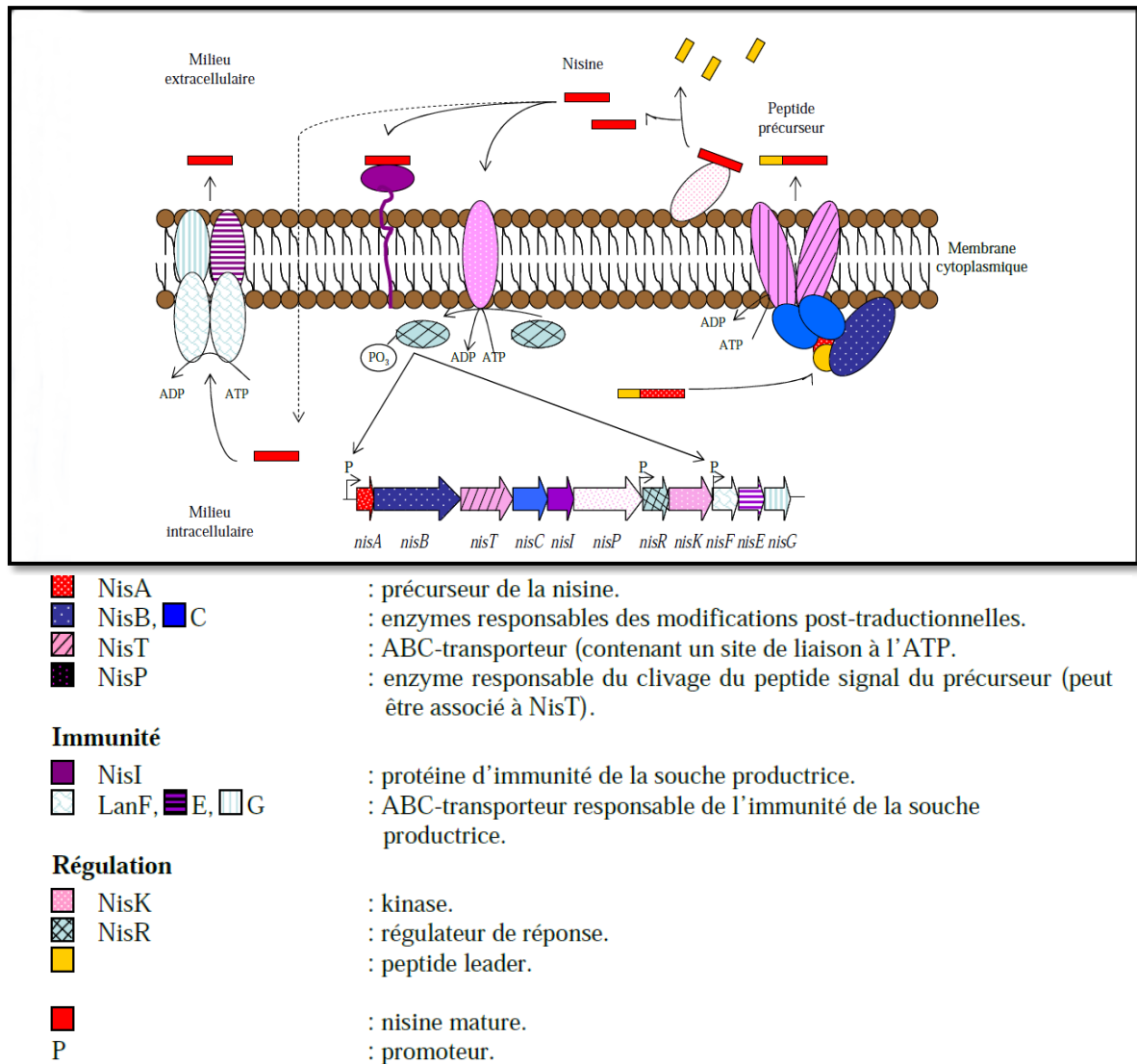


Fig.6 : Schéma de biosynthèse, de régulation et d'immunité de la souche productrice de la nisine (Makheloufi et al., 2011).

1.3. Spectre d'activité

La nisine a un spectre d'activité très large, une action inhibitrice sur les bactéries G^+ , notamment sur des cellules végétatives et des spores de *Clostridium* et *Bacillus*. (Meghrous et al, 1999).

Dans des conditions normales, les bactériocines produites par des bactéries à Gram positif n'ont pas d'effet bactéricide sur des espèces à Gram négatif. Cependant, la nisine présente une activité inhibitrice contre des souches d'*Helicobacter pylori* et de *Neisseria* (Mota-Meira et al., 2000).

En effet, les LPS des bactéries à Gram négatif empêchent la nisine d'atteindre la membrane cytoplasmique (Kalchayamand et *al.*, 1992), évitant ainsi la lyse cellulaire. Toutefois, l'action de la nisine peut être élargie aux bactéries G⁻ et aux G⁺ résistantes à condition de la fragiliser par un traitement physique ou chimique. En effet l'action de la nisine est plus efficace, une fois elle est combinée soit avec des traitement thermiques chauds (Maisnier-Patin et *al.*, 1995), soit avec des traitements froids (Kalchayamand et *al.*, 1992), soit avec l'EDTA (Stevens et *al.*, 1991).

1.4. Mode d'action

Selon Oscaris et *al.*, (2001), les membranes cytoplasmiques restent les principales cibles d'action des bactériocines, mais ces dernières peuvent altérer les différentes fonctions essentielles à la vie de la cellule cible (transcription, traduction, biosynthèse de la paroi bactérienne).

La nisine agit comme un détergent cationique; la dépolarisation des membranes par la nisine s'accompagne de la formation de pores au niveau de la double couche phospholipidique entraînant ainsi un épuisement de la force proton motrice des cellules cibles. Ceci cause une perte de potentiel membranaire et du gradient de pH, un afflux non spécifique d'acide aminés, de cations, une fuite d'ATP et conduit ainsi à une situation incompatible avec la viabilité cellulaire (Sahl et *al.*, 1987 ; Klaenhammer, 1993).

Le deuxième mode d'action de la nisine est l'inhibition de la biosynthèse de la paroi cellulaire (Reisinger et *al.*, 1980), 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 (Mc Auliffe et *al.*, 2001).

1.5. Toxicité de la nisine

La nisine a reçu le statut de GRAS (Generally Recognizer As Safe) et est la seule bactériocine approuvée comme agent de conservation par l'organisation mondiale de la santé (Delves-Broughton et *al.*, 1996). Sa forme commerciale est utilisée dans de nombreux procédés alimentaires.

La nisine est produite par des souches de *Lactococcus lactis* présentes naturellement dans le lait cru et dans le fromage, ce que prouve sa nature non toxique. En

effet, pendant des années, elle a été consommée par les humains et les animaux sans qu'aucun effet nuisible pour la santé ne soit détectable. 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 ADI (Average Daily Intake) de 0 à 33 mg de nisine par kg de poids corporel (Turtell et Delves-Broughton, 1998).

1.6. Rôle de la nisine dans la conservation des aliments

L'utilisation de la nisine comme un bio-conservateur en industrie agro-alimentaire semble très prometteuse. Le secteur le plus exploitant la nisine comme moyen de stabilisation est l'industrie alimentaire. Dans les fromages, elle est utilisée pour contrôler le développement de *Clostridium butyricum* et *C. tyrobutyricum* responsables de la transformation de l'acide lactique en acide butyrique et provoquant ainsi une perte de goût. Dans les pays à climat chaud, elle est utilisée pour augmenter la durée de vie du lait et des boissons laitières (De Vuyst et Vandamme, 1994).

L'emploi de la nisine dans l'industrie brassicole a été proposé pour la première fois en 1985 par Ogden et Tubb. Le fait qu'elle empêche ou réduit le taux de contamination par les bactéries lactiques et d'autres bactéries à Gram positif sans affecter les caractéristiques gustatives de la bière ni la viabilité et les performances de fermentation de la levure (Ogden et Waites, 1986).

Partie II

Etude expérimentale

Chapitre I

Matériel et méthodes

I. Matériel

La partie expérimentale a été effectuée au sein du laboratoire pédagogique de microbiologie, faculté des sciences biologiques et sciences agronomiques de l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'obtention du Diplôme Master académique en biotechnologie microbienne. Au cours de cette étude nous avons évalué l'activité antibactérienne de l'HE de *Cedrus atlantica* et celle de la bactériocine: nisine et leur effet combiné.

1. Appareillage

Tableau I: Appareils utilisés.

Appareillage	Compagnie
Agitateur a barreau magnétique chauffant	GARHARDT. Allemagne.
Autoclave	WEBECO. Allemagne
Bain marie	MEMMERT. Allemagne
Balance	KERN 770. Allemagne
Balance de précision	KERN 770. Allemagne
Etuve	BINDER. Allemagne
Réfrigérateur	ENIEM. Algérie
Spectrophotomètre	Vis-7220G. Biotech Engineering. Management CO.LTD (UK).
Vortex	HEIDOLPH. Allemagne

2. Les souches bactériennes testées

L'activité antibactérienne de l'HE de cèdre et la nisine a été testée sur des souches de références appartenant à l'American Type Culture Collection (ATCC), fournies par le

laboratoire pédagogique commun de microbiologie et le laboratoire de recherche en microbiologie de l'UMMTO. L'ensemble de ces souches sont décrites dans le tableau II.

Tableau II: Tableau descriptif des différentes souches bactériennes testées.

Les bactéries testées	Gram
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Négatif
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Négatif
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KP 700603	Négatif
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	Positif
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Positif
<i>Staphylococcus aureus</i> MV 50	Positif

3. Les milieux de culture

Tableau III: Tableau descriptif des milieux de culture utilisés.

Milieux de culture	Utilisation
Gélose de Muller Hinton (MH)	Etude de la sensibilité des bactéries aux agents antimicrobiens
Gélose nutritive (GN)	Repiquage des colonies
Bouillon Brain Heart Infusion Broth (BHIB)	Revivification et enrichissement des souches bactériennes testées
Gélose Chapman	Culture de <i>staphylococcus aureus</i> .
Gélose Hektoen	Culture des bactéries Gram négatif: <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 et <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.

4. Les antibiotiques utilisés

Tableau IV: Les antibiotiques utilisés et leur valeurs de diamètres critiques (CASFM, 2018)*.¹

(CASFM: Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de microbiologie).

Nom	Abréviation	Quantité par disque	Famille	Diamètre critique (mm)	
				Sensible	Résistante
Vancomycine	VA	30 µg	Glycopeptides	≥ 12	< 12
Pénicilline	P	10 µg	Pénicilline	≥ 29	< 29
Céfotaxime	CTX	30 µg	Céphalosporines de 3 ^{ème} génération	≥ 26	< 23
Kanamycine	K	30 µg	Aminoside	≥ 17	< 15
Céfalexine	CN	10 µg	Céphalosporines de 3 ^{ème} génération	≥ 18	< 12
Oxytétracycline	O	30 µg	Tétracyclines	≥ 20	< 20
Tétracycline	TE	30 µg	Cyclines	≥ 19	< 17
Pefloxacin	PEF	5 µg	floroquinolones	≥ 22	< 16

5. L'huile essentielle testée

L'huile essentielle utilisée durant notre partie expérimentale nous a été fournie par M^r. OUELHADJ A., elle est 100% pure et obtenue par hydrodistillation.

Tableau V: Description de l'HE utilisée.

Huile essentielle	Nom latin	Provenance	Contrôle
L'huile essentielle	<i>Cedrus Atlantica</i>	Laboratoire Pierre Fabre, France	Certifié par ECOCERT

*https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2018/12/CASFMV2_SEPTEMBRE2018.pdf

6. La bacteriocine utilisée

La bactériocine employée a été isolé de *Lactococcus lactis* (E234 ; CAS number 1414- 45- 5, formule chimique : $C_{143}H_{230}N_{42037}S_7$), provenant de la compagnie Sigma-Quimica , avec une masse moléculaire de 3354.12 Da.

II. Méthodes

1. Revivification microbiologique des souches microbiennes

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

2. Vérification de la pureté des souches bactériennes

2.1. Repiquage sur les milieux sélectifs

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

2.2. Examens microscopiques

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

- Réalisation d'un frottis sur une lame en verre contenant une goutte d'eau à partir d'une colonie bactérienne isolée;
- Dépôt de ce prélèvement au milieu de la lame en faisant des rotations;
- Fixation du frottis en passant la lame 3 fois dans la flamme du bec bunsen;
- Coloration au violet de gentiane (colorant basique) ou cristal violet et laisser agir pendant 30 secondes à 1 minute (toutes les bactéries sont colorées en violet) puis rincer à l'eau;
- Mordançage au Lugol: étaler le Lugol et laisser agir le même temps que le violet de Gentian puis rincer à l'eau. Cette étape permet de stabiliser la coloration violette.

- Décoloration à l'alcool: verser goutte à goutte l'alcool sur la lame inclinée obliquement. Surveiller la décoloration (5 à 10 secondes). Le filet doit être clair à la fin de la décoloration. Rincer sous un filet d'eau;
- Contre coloration avec la fuchsine, laisser agir de 30 secondes à 1 minute. Laver doucement à l'eau. Sécher au-dessus de la flamme d'un bec bensen;
- Observation au microscope optique à l'objectif $\times 100$ (à l'huile d'immersion).

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

3. Etude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Cedrus atlantica* et celle de la Nisine

3.1. Pré-enrichissement des souches bactériennes

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

Afin d'obtenir des colonies bien isolées qui serviront à la standardisation de l'inoculum, l'ensemencement a été réalisé par la méthode des trois quadrants. Ensuite l'incubation des boîtes de Pétri se fait à 37°C pendant 18h préférentiellement et au plus tard 24h afin d'obtenir des colonies jeunes en phase de croissance exponentielle.

3.2. Préparation des suspensions bactériennes

Une suspension bactérienne de densité équivalente au standard 0,5 de Mc Farland (10^8 UFC.mL⁻¹) a été préparée à partir d'une culture pure et jeune (âgée de 18h).

- A l'aide d'une anse de platine, racler quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques à partir des boîtes de Pétriensemencées précédemment;
- Déposer les colonies dans un volume d'eau physiologique stérile à 0,9% de chlorure de sodium (NaCl);
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne;
- Réaliser une standardisation de la suspension à l'aide d'un spectrophotomètre réglé sur longueur d'onde de 625nm et la densité optique est ajustée à 0,08 – 0,10.

Cette densité mesurée à 625nm est équivalente à 10^8 UFC/ml (Haddouchi et *al.*, 2016).

L'ajustement de l'inoculum bactérien se fait en fonction de la charge: Soit par ajout de la culture si la DO est faible ou de l'eau physiologique stérile s'il est trop chargé.

L'ensemencement doit se faire en moins de 30 min après la préparation de l'inoculum.

3.3. Evaluation de l'activité antibactérienne *in vitro* de l'huile essentielle de *Cedrus atlantica*

L'étude a été réalisée par méthode de diffusion sur gélose, conçue initialement pour les antibiotiques, mais en substituant les disques d'antibiotiques par d'autres imprégnés d'huile essentielles (Figure 7), appelée aromatogramme ou encore méthode des disques.

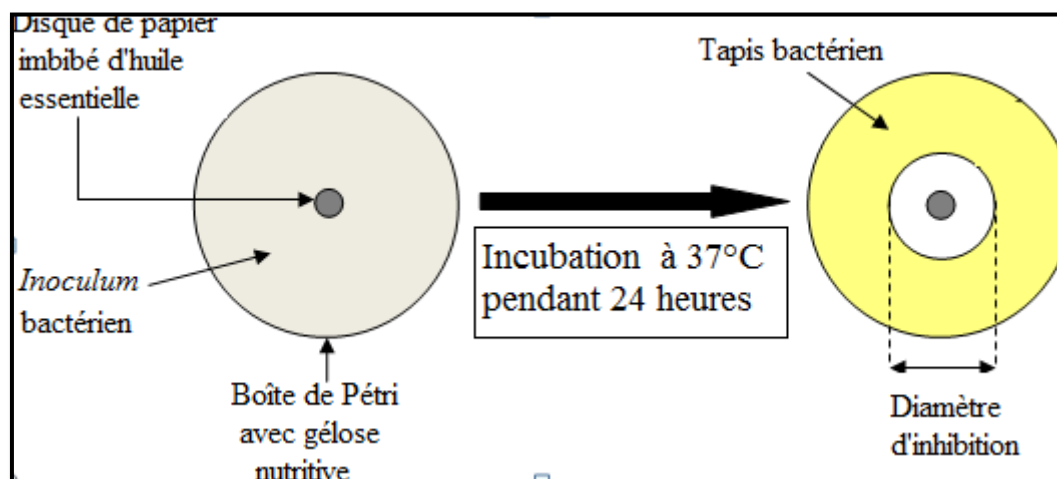


Fig.7 : Principe de la méthode de diffusion par disques (Guinoiseau, 2010).

Cette méthode est reconnue comme fiable et reproductible, en plus de ça, elle constitue surtout aussi une étape préliminaire à des études plus approfondies, car elle permet d'accéder à des résultats essentiellement qualitatifs (Dima, 2016). Elle permet également de mettre en évidence l'effet antimicrobien de l'HE et de déduire la résistance et la sensibilité des souches microbiennes (Amara et *al.*, 2017).

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

Des géloses de Mueller Hinton (MH) coulées dans des boîtes de Pétri sont ensemencées uniformément à l'aide d'une micropipette de 100 μ l de chaque suspension bactérienne standardisée, celles-ci ont été étalées à l'aide d'un râteau de pipette Pasteur.

Des disques de papier Whatman stériles de 6 mm de diamètre, imprégnés avec 10 μ l d'une préparation d'HE additionnée de DMSO à raison de 5% (v/v) ont été laissées sécher pendant quelques instant (pas trop longtemps pour éviter l'évaporation de l'HE).

Pour chaque souche bactérienne testée, ces disques ont été déposés au milieu des boîtes de Pétri contenant les géloses ensemencées.

D'autres disques chargés de 10 μ l de DMSO ont été déposés dans des boîtes de géloses MH préalablement ensemencées de chaque souche bactérienne testée, pour servir de témoins négatifs.

Les témoins positifs ont été réalisés par dépôt de disques d'antibiotiques dans des boîtes ensemencées avec les suspensions bactériennes standardisées.

Les boîtes ensemencées contenant les disques d'huile essentielle ont été mises à 4°C pendant 2 heures pour faciliter la diffusion d'HE. Le test a été répété deux fois.

- L'incubation des boîtes se fait dans l'étuve à 37°C pendant 24h.

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

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

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

3.4. Evaluation de l'activité antibactérienne *in vitro* de la bactériocine (nisine)

L'activité de la nisine a été testée par la même méthode que l'huile, c'est-à-dire la méthode de l'antibiogramme. La nisine a été dissoute dans du HCL à 0,02 N de façon à obtenir une concentration de 1,5 mg/ml (Khaddour et *al.*, 2003).

Des disques de papier Whatman stériles de 6 mm de diamètre, imprégnés avec 10 µl de la solution de nisine, ont été laissés sécher pendant quelques instants.

Pour chaque souche bactérienne testée, ces disques ont été entreposés au milieu des boîtes de Pétri contenant les géloses ensemencées.

D'autres disques chargés de 10µl d'HCL à 0,02 N ont été déposés dans des boîtes de géloses MH préalablement ensemencées avec une suspension standardisée de chaque souche bactérienne testée, pour servir de témoins négatifs.

Les témoins positifs ont été réalisés par dépôt de disques d'antibiotiques dans des boîtes ensemencées avec les suspensions bactériennes standardisées.

Tous les essais ont été répétés deux fois.

Les boîtes ensemencées contenant les disques de la bactériocine (nisine) ont été mises à incubation dans l'étuve à 37°C pendant 24h.

3.5. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de l'huile de cèdre

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

La concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'HE étudiée a été déterminée suivant la technique de macrodilution en milieu liquide rapportée par (Guinoiseau, 2010) (figure8). Cette technique consiste à inoculer, par un inoculum standardisé, une gamme de concentration décroissante en huile essentielle. Après incubation, l'observation de la gamme permet d'accéder à la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI), qui correspond à la plus faible

concentration en huile essentielle capable d'inhiber la croissance bactérienne. Les micro-organismes restent cependant viables (Mahfouf et *al.*, 2017)

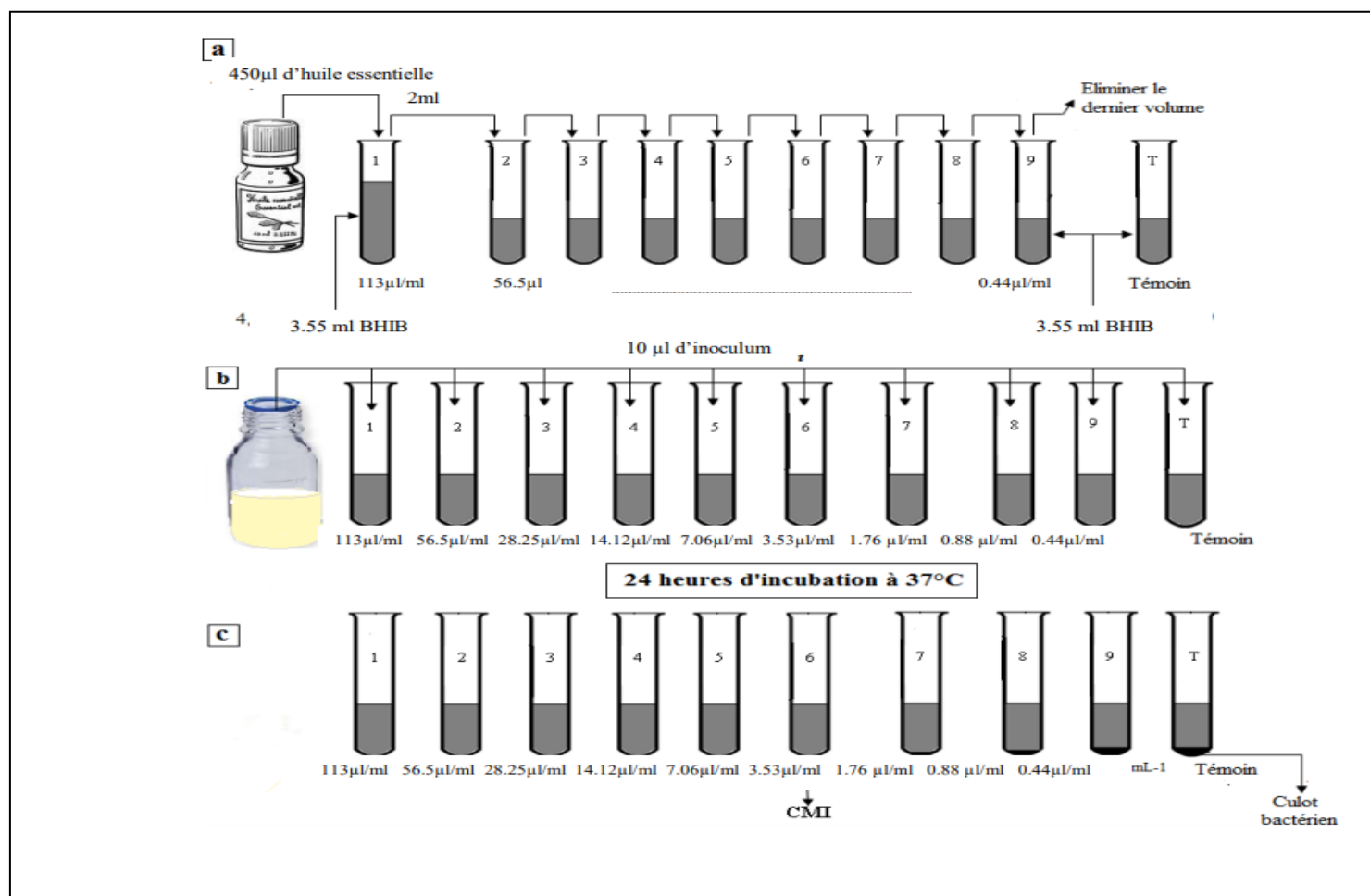


Fig.8: Méthode de détermination de la CMI en milieu liquide (Guinoiseau, 2010).

L'HE est dissoute dans du DMSO 5 % (v/v) afin de favoriser le contact germe/huile.

450 μ l de l'HE à tester additionnée en DMSO (5% v/v) est placée dans un tube stérile contenant 3.55ml du bouillon BHIB. Ce tube correspond à la solution mère à partir de laquelle des dilutions sont réalisées. Des dilutions un demi en série ont été préparées dans une gamme de concentration comprise de 63,38 et 0,12 μ l/ml dans des tubes à essai stériles contenant le bouillon BHIB, pour cela, nous avons besoin de 10 tubes où à chaque fois il faut prélever 2 ml d'un tube et les verser dans le tube suivant, ainsi jusqu'au 10^{ème} tube à partir duquel il faut prélever 2 ml et les jeter. Les valeurs de dilutions sont résumées dans le tableau VI.

Tableau VI: Les dilutions utilisées pour déterminer les CMI.

Tubes	S M	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Rapport de dilution De l'HE	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024
%	100	50	25	12.50	6.25	3.12	1.50	0.78	0.40	0.20	0.10
µl HE/ml	126,76	63,38	31,69	15,84	7,92	3,96	1,98	0,99	0,49	0,24	0,12

10,5 µl d'inoculum bactérien de 10^6 UFC/ml est déposé 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 un tube contenant 2ml du milieu BHIB supplémenté en DMSO 5 % (v/v), est également réalisé. Ainsi qu'un témoin négatif a été réalisé par l'ajout de 10µl de DMSO dans un tube contenant 2ml de BHIB.

Chaque essai est répété deux fois. Ensuite, les tubes sont incubés à 37 °C pendant 24 heures.

Après incubation, tous les tubes sont examinés, et la CMI (µl/ml) est déterminée en prenant en compte la plus faible concentration en HE qui inhibe tout développement bactérien (absence de turbidité).

3.6. Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) de l'huile de cèdre

La Concentration Minimale Bactéricide (CMB) correspond à la plus faible concentration en huile essentielle capable de tuer plus de 99,9 % de l'inoculum bactérien initial (soit moins de 0,01 % de survivants). Elle définit l'effet bactéricide d'une huile essentielle (Guinoiseau, 2010).

La même gamme de concentration, réalisée par la technique de macrodilution en milieu liquide réalisée pour la CMI, est utilisée pour déterminer la CMB de l'huile essentielle à tester (figure 9).

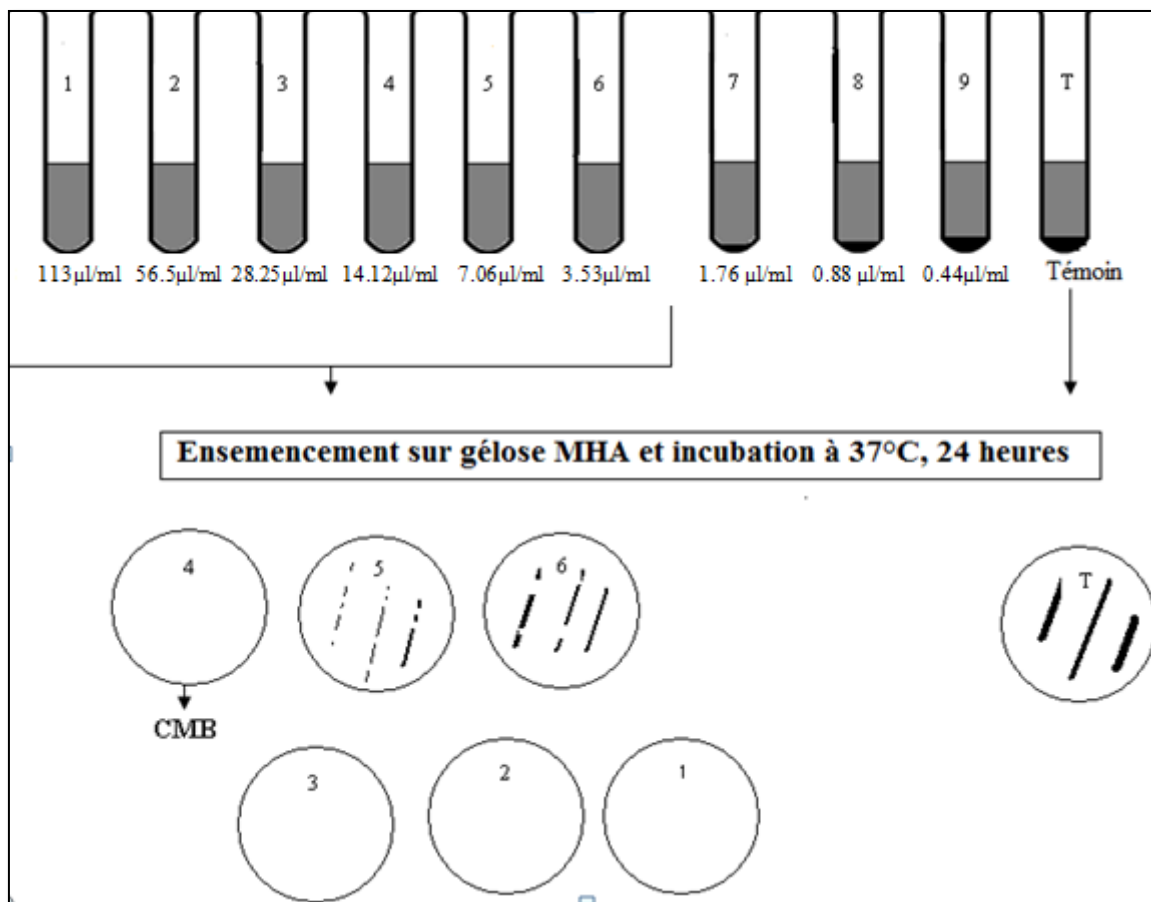


Fig.9: Méthode de la détermination de la CMB en milieu solide (Guinoiseau, 2010).

Des prélèvements de 100 µl sont effectués dans les tubes témoins et dans chacun des tubes dépourvus de culot bactérien puis déposés à l'aide d'une micropipette sur gélose MH et étalés à l'aide d'un râteau de pipette Pasteur. Les boîtes ensemencées sont incubées 24 heures à 37°C.

La CMB de l'huile essentielle est déduite à partir de la première boîte dépourvue de bactérie. Chaque expérience est réalisée deux fois au cours de deux expériences successives.

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

4. Etude de l'effet de combinaison de l'huile essentielle avec la nisine**4.1. Test de sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis de la combinaison de l'huile essentielle de cèdre et la nisine**

Cette combinaison est réalisée afin de tester l'activité antibactérienne et de mettre en valeur un éventuelle effet synergique entre l'HE et la nisine sur les souches bactériennes testées.

Ce test consiste à réaliser des combinaisons entre l'huile et la nisine à trois différentes concentrations différentes émulsifiées dans le DMSO à raison de 5% (v/v).

- 25% d'huile +75% de nisine;
- 50% d'huile + 50% de nisine;
- 75% d'huile +25% de nisine.

Des disques stériles de papier Whatman de 6 mm de diamètres imbibés de 10 µl de chaque concentration déposés sur des boites pétri préalablement ensemencées avec une suspension bactérienne standardisée. Les résultats obtenus seront comparés aux résultats de la nisine et de l'HE séparément.

Le témoin positif et le témoin négatif ont été réalisés par dépôt au centre des boites de Pétri préalablement ensemencées avec une suspension bactérienne standardisée de disques d'antibiotiques et de disques de papier Whatman imprégnés de 10 µl d'un mélange de 50% de DMSO et de 50% d'HCL à 0,02N. Tous les essais ont été répétés deux fois.

Après l'incubation à 37° pendant 24h, une lecture a été faite comme cité précédemment dans l'aromatogramme.

D'après Pibiri (2005), il existe quatre effets antimicrobiens de la combinaison :

- Indiffèrent ($A+B = \text{Effet A ou Effet B}$);
- Addition ($A+B = \text{Effet A} + \text{Effet B}$);
- Synergie ($A+B > \text{Effet A} + \text{Effet B}$);
- Antagonisme ($A+B < \text{Effet A ou Effet n B}$).

Chapitre II

Résultats et discussion

1. Résultats du test de vérification des souches bactériennes

La coloration de Gram est un test essentiel permettant de différencier les bactéries Gram positif des bactéries Gram négatif et l'observation des caractères morphologiques de différentes souches bactériennes testées (Tableau VII).

Tableau VII : Les caractères morphologiques des souches bactériennes testées

Souches bactériennes	Milieux de culture	Gram	Aspect microscopique
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Gélose Hektoen	Négatif	Coccobacilles de couleur rose
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	Gélose nutritive	Positif	Bacilles de couleur violette
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Gélose Hektoen	Négatif	Bacilles roses
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Gélose Chapman	Positif	Cocci en grappes de raisin de couleur violette
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KP 700603	Gélose Hektoen	Négatif	bâtonnets encapsulés et non mobile.
<i>Staphylococcus aureus</i> MV 50	Gélose Chapman	Positif	Cocci en grappe de raisin de couleur violette

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

2.1. Résultats des témoins négatifs réalisés avec le DMSO et l'HCL

Le Diméthyle sulfoxyde (DMSO), est un solvant organique polaire, miscible à l'eau, utilisé pour avoir une meilleur diffusion de l'HE dans le milieu (Lahlou, 2004).

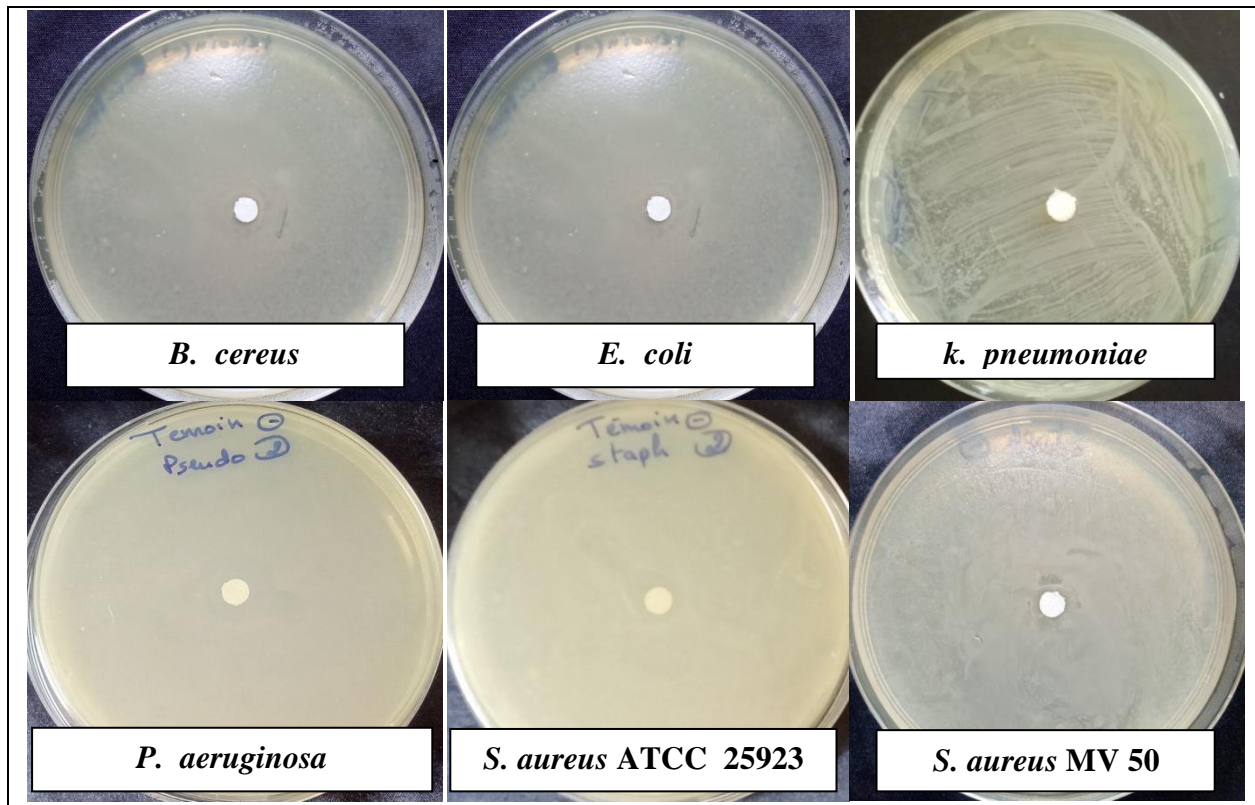


Fig. 10: Résultats des témoins négatifs réalisés avec DMSO sur les bactéries testées.

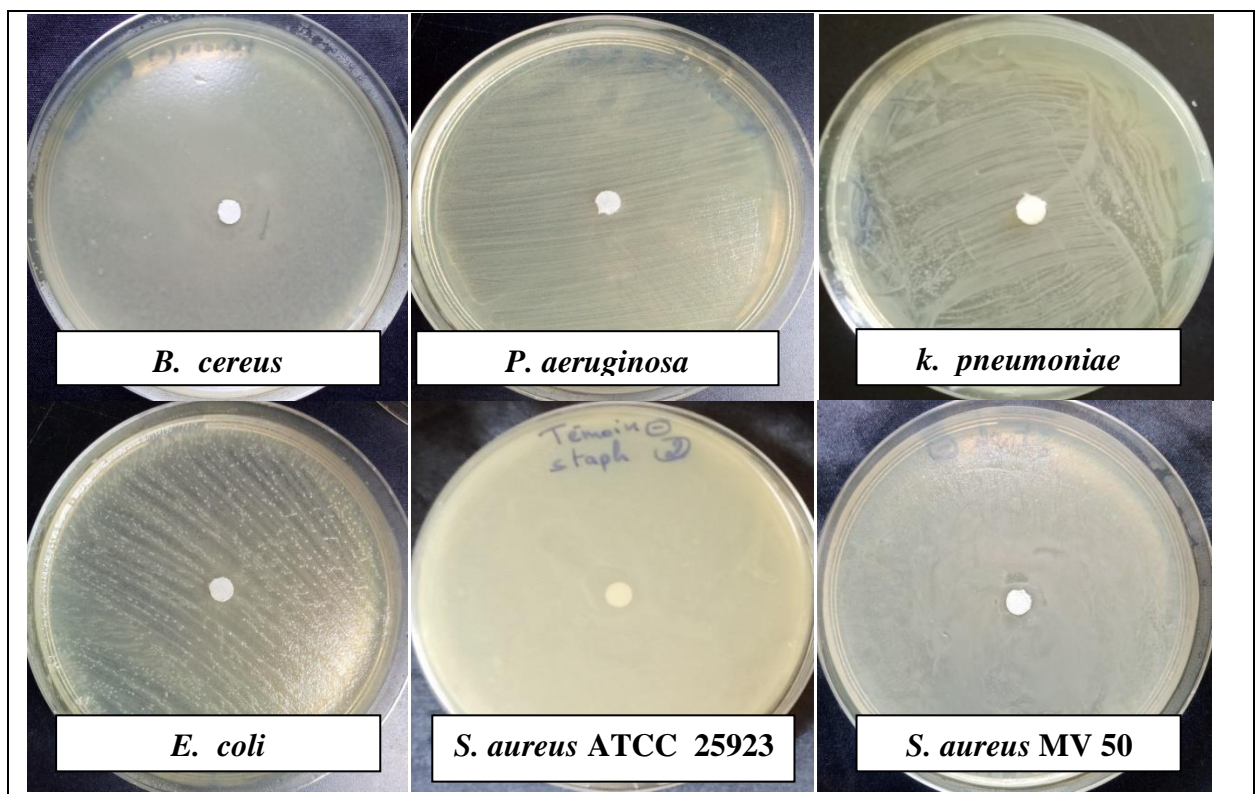


Fig. 21: Résultats des témoins négatifs réalisés avec HCL sur les bactéries testées.

L'activité antibactérienne du DMSO et l'HCL évaluée sur les six souches bactériennes étudiées par la méthode de diffusion sur milieu gélosé, n'a montrée aucune activité.

2.2. Résultats des témoins positifs

L'antibiogramme consiste à déterminer *in vitro* la sensibilité et la résistance des bactéries aux antibiotiques et dépister les résistances acquises. Les antibiotiques diffusent dans la gélose à partir des disques de telle sorte qu'autour de chacun d'eux s'établit un gradient de concentration (Figure 12).

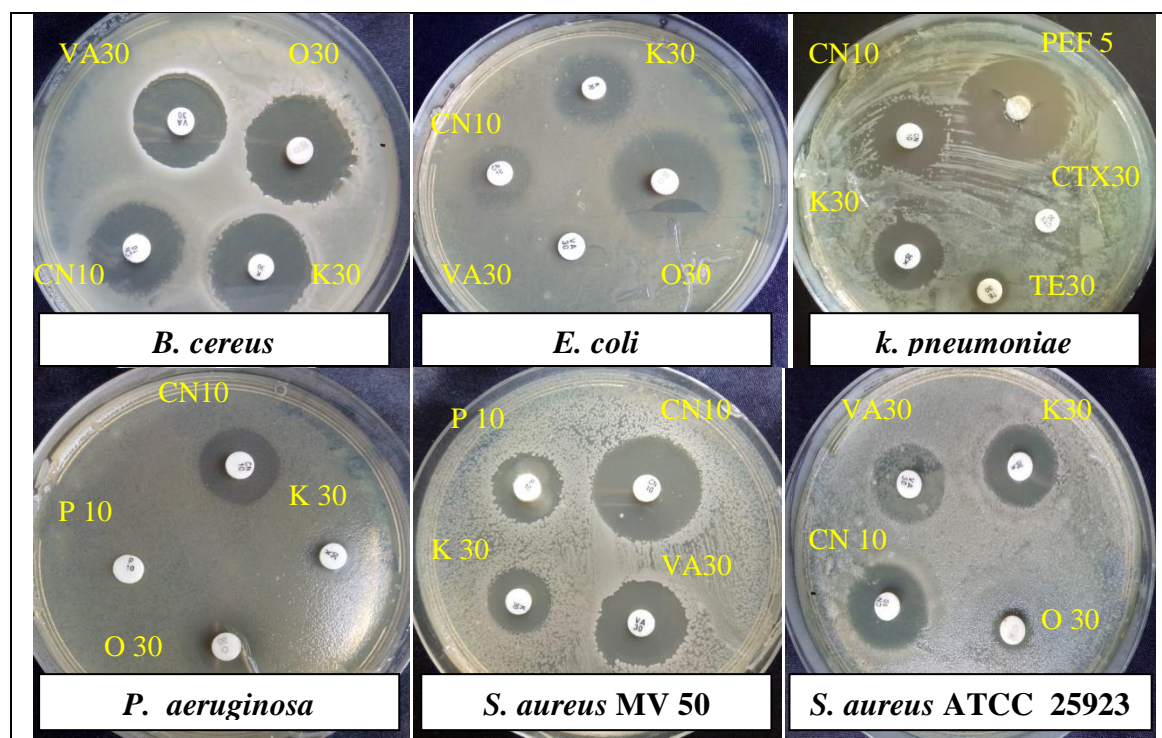


Fig.12: Résultats de l'antibiogramme réalisés avec des disques d'antibiotiques sur les six souches.

La détermination des diamètres des zones d'inhibition permet une estimation de la sensibilité ou de la résistance de la souche bactérienne aux différents antibiotiques, le tableau ci-dessous rapporte les valeurs en millimètres des zones d'inhibition manifestées par les antibiotiques sur les différentes souches bactériennes étudiées.

Tableau VIII: Résultats des diamètres des zones d'inhibition en mm (moyennes \pm écart types) des antibiotiques sur les souches bactériennes testées.

Souches bactériennes	Les antibiotiques utilisés et les diamètres critiques des zones d'inhibition \pm l'écart type							
	CTX	PEF	CN	K	TE	P	O	VA
<i>E. coli</i> ATCC 25922	NT	NT	15,00 \pm 00,00	20,00 \pm 00,00	NT	NT	27,50 \pm 0,5	20,5 \pm 0,50
<i>B. cereus</i> ATCC 14579	NT	NT	21,00 \pm 00,00	26,00 \pm 00,00	NT	NT	26,50 \pm 00,50	22,00 \pm 00,00
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	NT	NT	18,00 \pm 00,00	12,75 \pm 00,82	NT	06,00 \pm 00,00	13,00 \pm 00,00	NT
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	NT	NT	20,00 \pm 00,00	19,00 \pm 00,00	NT	NT	10,00 \pm 00,00	18,00 \pm 00,00
<i>K. pneumoniae</i> KP 700603	06,00 \pm 00,00	29,50 \pm 00,05	21,50 \pm 00,50	21,00 \pm 01,00	09,50 \pm 00,05	NT	NT	NT
<i>S. aureus</i> MV 50	NT	NT	24,00 \pm 01,00	15,25 \pm 00,04	NT	16,25 \pm 0,08	NT	19,5 \pm 00,50

Les diamètres des disques (6mm) sont inclus dans la mesure des diamètres des zones d'inhibitions.

NT : non testé.

D'après les résultats consignés dans les tableaux IV et VIII, nous constatons que les bactéries présentent une sensibilité ou une résistance différente vis-à-vis des ATBs en fonction de la souche et du type d'antibiotique utilisé.

Toutes les bactéries testées s'avèrent sensibles à la Céfalexine et la Kanamycine à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) qui est résistante à ce dernier et elle ne manifeste aussi aucune sensibilité vis-à-vis de la Pénicilline et de l'Oxytétracycline.

La souche *Klebsiella pneumoniae* (KP 700603) testée a montrée également une sensibilité au Pefloxacin tandis qu'elle est résistante à la Tétracycline et la Céfotaxime. En revanche les souches *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Bacillus cereus* (ATCC 14579) et *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) testées présentent une sensibilité vis-à-vis la Vancomycine alors que *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) est sensible à l'Oxytétracycline.

3. Résultats du test de sensibilité à l'huile essentielle testée

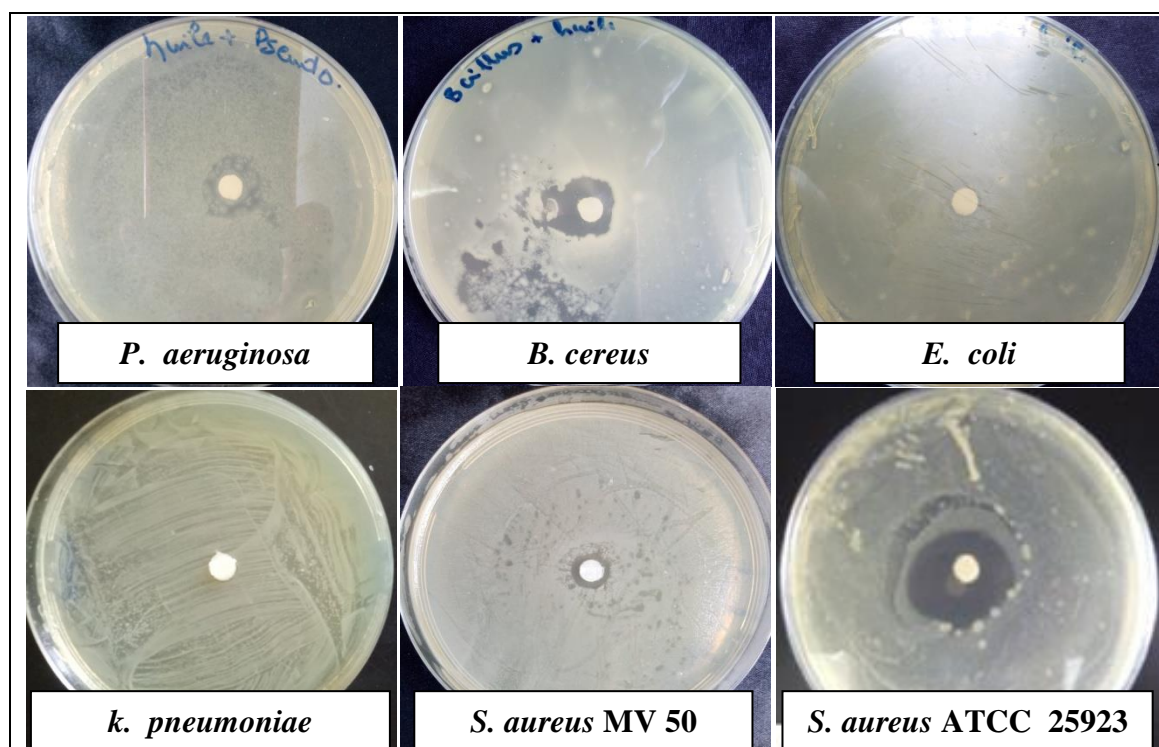


Fig. 13: Effet de l'HE de *Cedrus atlantica* sur les six souches bactériennes testées.

Les diamètres des zones d'inhibition ainsi que la sensibilité des souches testées vis-à-vis de l'HE de *Cedrus atlantica* sont résumés dans le tableau IX:

Tableau IX: Résultats des diamètres d'inhibition en mm (moyennes \pm écart types) de l'activité antibactérienne de *Cedrus atlantica* sur les six souches bactériennes testées.

HE Souches	<i>Cedrus atlantica</i>	Sensibilité
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	11,00 \pm 0,50	(+)
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 72853)	13,00 \pm 2,12	(+)
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	24,75 \pm 4,38	(+++)
<i>S. aureus</i> (MV 50)	11,00 \pm 0,50	(+)
<i>B. cereus</i> (ATCC 14579)	13,75 \pm 1,29	(+)
<i>K. pneumoniae</i> (KP 700603)	06,00 \pm 0.00	(-)
Les diamètres des disques (6mm) sont inclus dans les mesures des zones d'inhibition.		

D'après les résultats de notre test biologique, nous pouvons constater que l'huile essentielle de *Cedrus atlantica* a manifestée de variables caractéristiques antibactériennes dépendantes des microorganismes testés.

D'ailleurs, d'après la figure 13 et les résultats du tableau précédent, on remarque que l'HE de *Cedrus atlantica* s'est montrée d'une efficacité antibactérienne importante vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 avec un diamètre d'inhibition de 24,75 mm, d'autre part, les autres bactéries telles que *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* MV 50 se sont montrées faiblement sensible vis-à-vis de l'HE testée avec des zones d'inhibition respectivement de 13,75mm, 13mm, 11mm et 11mm. Par contre, on a pu constater que seule *Klebsielle pneumoniae* parmi toutes les souches bactériennes testées n'a pu être inhibée par l'HE du cèdre de l'atlas.

Contrairement aux antibiotiques utilisés, l'effet inhibiteur de cette HE sur la croissance de la plupart des souches testées est faible puisque les diamètres des zones d'inhibitions obtenues sont inférieurs à ceux obtenus vis-à-vis des antibiotiques utilisés, mis à part celui *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 qui a manifesté une zone importante vis-à-vis de l'HE testée.

Habituellement, les bactéries à Gram négatif sont connues pour leur résistance à l'effet inhibiteur des HEs, par rapport aux bactéries à Gram positif, et ce grâce à la structure particulière de leur membrane externe (Akbali et al., 2016). D'après nos résultats, on remarque que le type de Gram n'a pas d'influence sur l'efficacité de l'HE testée vue que les zones d'inhibition de l'huile de Cèdre pour *S. aureus* ATCC 25923 (Gram positif) est de 24,75mm, 13,75mm pour *B. cereus* (Gram positif) et 11mm pour *S. aureus* MV 50 qui est aussi un Gram positif, et 13mm et 11mm pour *P. aeruginosa* et *E. coli*, respectivement, qui sont des Gram négatif; on constate alors que l'activité de l'HE de *Cedrus atlantica* testée ne varie pas en fonction du type de Gram.

Concernant les composés majoritaires de l'HE de *Cedrus atlantica* selon la bibliographie sont: E- α -atlantone (28,75%), β -himachalène (14,62%) et l'himachalol (7,11%). Ils sont des composés terpéniques, qui ne présentent aucun pouvoir antibactérien (Aberchane et al., 2003). De plus, plusieurs études ont confirmées que l'activité antimicrobienne des HEs n'est pas toujours attribuée aux principaux composés, mais peut être due aux interactions de synergisme ou antagonisme avec d'autres composés mineurs (EL Malki et al., 2018).

L'étude de Satrani et *al.*, (2006), a montrée que plusieurs microorganismes testés à l'huile essentielle de *Cedrus atlantica* sont inhibés complètement, ce qui explique nos résultats trouvés vis-à-vis des 5 souches inhibées. Ce pouvoir est dû essentiellement à sa composition chimique riche en alcools terpéniques (himachalol, cedros, isocedranol et 1-epicubenol) dont le taux global atteint environ 24,40%.

De plus, l'étude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle des feuilles de *Cedrus atlantica* de Maroc effectuée par Derwich et *al.*, (2010), a indiquée que *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* était les souches les plus sensibles parmi celles testées, avec les plus fortes zones d'inhibition 25mm, 21mm et 22mm, respectivement. *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus intermedius* et *Enterococcus faecalis*, se sont révélés moins sensibles que les bactéries précédentes avec des zones d'inhibition de 12mm, 19mm et 11mm, respectivement. Aucune activité n'a été observée contre *Bacillus sphaericus*.

Les huiles essentielles riches en α -pinène ont démontrées leur potentiel activité antibactérienne (Hajji et *al.*, 1993). Les principaux composants de cette huile, l' α -pinène, sont connus pour présenter une activité antibactérienne contre les souches bactériennes (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* et *Bacillus sphaericus*) (Bourkhiss et *al.*, 2000). Les hydrocarbures monoterpéniques, les terpènes, ont également montrés des propriétés antibactériennes modérées contre les bactéries Gram positif (Oyedeki et Afolayan, 2005).

De plus les cônes de *Cedrus libani* possèdent des remèdes anti-ulcérogènes pour le traitement contre l'activité d'*Helicobacter pylori* (Yesilada et *al.*, 1999).

En outre, Aberchane et *al.*, (2003), ont constaté que l'HE de *Cedrus atlantica* ne possède *in vitro* aucun pouvoir antibactérien, cela confirme le résultat obtenu vis-à-vis de *Klebsiella pneumoniae*.

De même, l'étude de Thielmann en 2019 qui s'est portée sur le Criblage de 179 huiles essentielles de 86 variétés de plantes pour leurs activités antimicrobiennes contre les bactéries pathogènes d'origine alimentaire *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, où il a ressorti que *S. aureus* était inhibée par 30 variétés d'HE et *E. coli* par 12 variétés, a révélé que l'HE de *cedrus atlantica* n'a aucun pouvoir inhibiteur sur les 2 souches testées.

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

4. Résultats du test de sensibilité à la bactériocine (nisine)

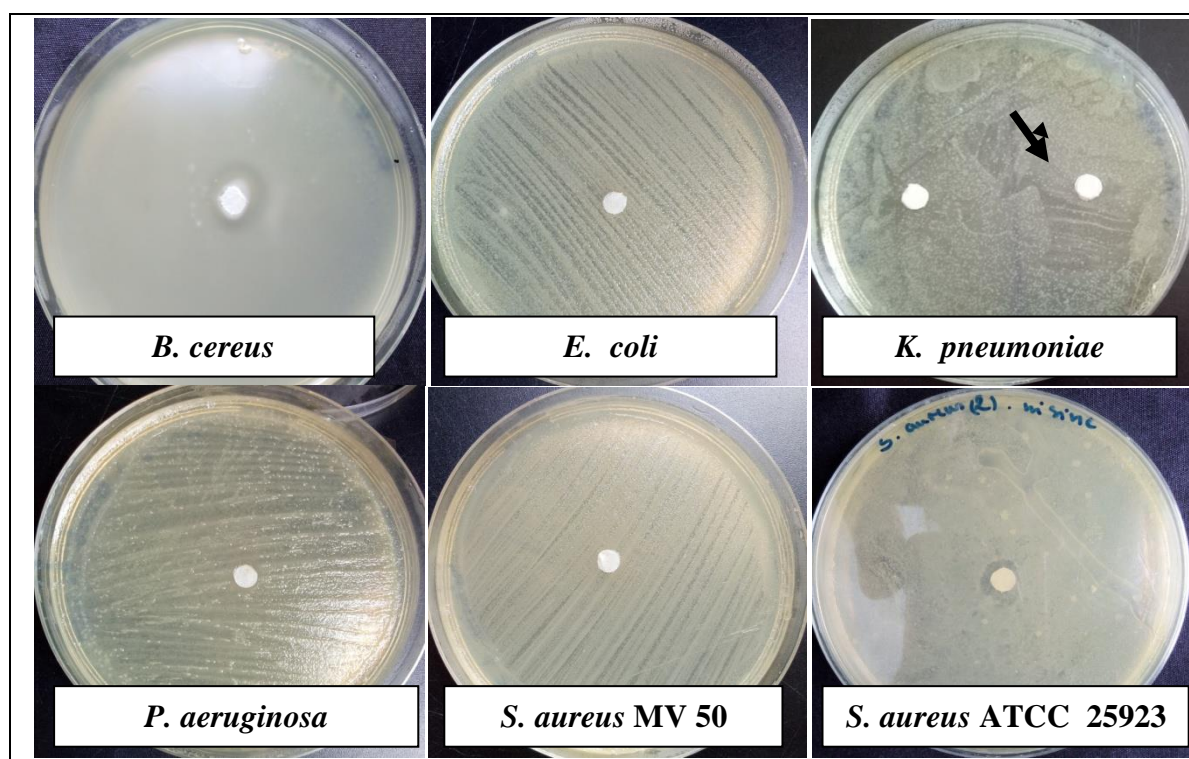


Fig. 14: Effet de la nisine sur les six souches bactériennes testées.

Les diamètres des zones d'inhibition ainsi que la sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis de la nisine sont résumés dans le tableau suivant:

Tableau X: Résultats des diamètres d'inhibition en mm (moyennes \pm écart types) et la sensibilité des souches bactériennes testées vis-à-vis de la nisine.

Souches	Nisine	Sensibilité
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	06,00 \pm 00,00	(-)
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 72853)	06,00 \pm 00,00	(+)
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	08,50 \pm 01,50	(+)
<i>S. aureus</i> (MV 50)	06,00 \pm 00,00	(+)
<i>B. cereus</i> (ATCC 14579)	10,50 \pm 01,50	(+)
<i>K. pneumoniae</i> (KP 700603)	06,00 \pm 00,00	(-)
Les diamètres des disques (6mm) sont inclus dans les mesures des zones d'inhibition.		

D'après les résultats présentés dans le tableau VIII, il ressort que les souches testées ne sont que faiblement sensible à la nisine. En effet, le test antibactérien de la bactériocine a montré que seules *S. aureus* (ATCC 25923) et *B. cereus* étaient sensibles à la nisine avec des zones d'inhibitions respectivement de 08,50 mm et 10,50 mm, par contre aucune activité n'a été détectée vis-à-vis de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* et *S. aureus* (MV50).

La différence dans la composition de l'enveloppe cellulaire des bactéries Gram positif et Gram négatif influence l'activité antibactérienne des bactériocines des bactéries lactique. En effet, selon les études effectuées par Abee, (1995), Cintas et *al.*, (2001) et Deegan et *al.*, (2006), il ressort qu'en générale, les bactériocines des bactéries lactiques ne sont pas actives contre les bactéries à Gram négatif. Toutefois, certaines études ont suggérées qu'un changement des propriétés de perméabilité de la membrane externe suite à certains traitements utilisés (l'ajout d'EDTA, lysozyme...etc.) en combinaison avec des bactériocines ou encore des conditions de stress rendraient les bactéries Gram négatifs sensibles aux bactériocines. Cependant, le spectre d'activité de quelque bactériocines (comme la nisine) peut ne pas être restreint aux espèces proches taxonomiquement ou même occupantes la même niche écologique que la bactérie productrice. D'un point de vue pratique, le champ d'activité d'une bactériocine peut être plus ou moins large suivant les conditions du milieu et la concentration en substance active (Klaenhammer, 1993).

En 2017, l'Autorité européenne de sécurité des aliments a réévalué le potentiel toxique de la nisine et a approuvée une dose journalière admissible allant jusqu'à 1 mg de nisine / kg de poids corporel par jour pour une utilisation dans certains aliments produits (MoBiTec GmbH, Germany, 2015)*¹. Cependant les recherches se sont dirigées vers d'autres alternatives de son utilisation, tels que sa combinaison avec d'autres substances. En effet, d'après les références consultées, on a pu déduire que la conservation des aliments avec la nisine se fait généralement par sa combinaison avec d'autres substances afin d'obtenir un effet plus fort mais à des concentrations faibles de la substance. Et cela, pour améliorer l'activité antibactérienne et pour limiter les phénomènes de résistance, ou encore pour lutter contre les bactéries Gram (-) insensibles aux bactériocines des bactéries lactiques, mais aussi pour améliorer les durées de conservation des aliments.

La combinaison nisine-pédiocine a démontrée une amélioration significative de l'activité antimicrobienne sur plusieurs bactéries Gram (+) comme *Enterococcus faecalis* et *L. monocytogenes* par rapport à l'utilisation de la nisine ou de la pédiocine seule (Hanlin et al., 1993).

De la même façon, l'inhibition de *L. monocytogenes* par la nisine associée à la sakacine (bactériocine de *Lactobacillus sakei*) est plus importante qu'avec la nisine seule (Katla et al., 2001). Dans ce cas, autant l'incorporation de la sakacine directement que l'introduction de la culture de *Lb. sakei* productrice de la sakacine présentent, par rapport à l'utilisation de la nisine seule, un effet antibactérien qui augmente les temps de conservation du saumon.

De plus, l'effet dans un premier temps du lysozyme, suivi de l'action de la nisine, montre que les bactéries Gram (-) sont lysées par la nisine. Le nombre de *Campylobacter jejuni*, *Pseudomonas fluorescens* ou encore *Salmonella enterica* est diminué de l'ordre de 6 log sous l'action de la nisine dès que le lysozyme à une concentration de 10 Pg.ml⁻¹ est utilisée (Carniero et al., 1998).

De la même façon, un agent chimique chélatant tel que l'EDTA provoque une désorganisation de la membrane externe des bactéries Gram (-) pour permettre l'action de la nisine. La diminution du pH indispensable à l'action de l'EDTA permet en parallèle d'améliorer l'effet de la nisine (Boziaris et Adams, 1999).

* <https://www.thefreelibrary.com/Newsletter+XVIII+Released+%2f+MoBiTec+GmbH%2c+Germany.-a0402054259>

A l'encontre de nos résultats, les résultats d'El Moulidi et *al.*, (2008) qui ont testé l'effet bactéricide de plusieurs bactériocines appartenant à des bactéries de différents genres, signalent des zones d'inhibition importantes avec les bactéries à Gram positif, pour *Staphylococcus aureus* ($\emptyset = 28,2$ mm), et les résultats obtenus avec les bactéries à Gram négatifs sont plus importants pour *Escherichia coli* ($\emptyset = 24,3$ mm), *Klebsiella pneumoniae* ($\emptyset = 22,1$ mm), *Pseudomonas aeruginosa* ($\emptyset = 21,2$ mm).

De même, les résultats trouvés par Ouelhadj et *al.*, (2017), s'affirment positifs sur toutes les bactéries testées avec des zones d'inhibition très importante vis-à-vis de la nisine, 24,5mm, 23mm et 21,5mm pour *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* (ATCC 4330) et *Pseudomonas aeruginosa*, respectivement et 13,5mm, 18mm et 12,5mm vis-à-vis d'*Escherichia coli* (ATCC 4330), *Escherichia coli* et *klebsiella pneumoniae*, respectivement.

L'efficacité de la nisine est souvent affectée par des facteurs environnementaux tels que le pH, la température, la composition et la structure des aliments, ainsi que le microbiote alimentaire. Le développement de la résistance à la nisine a été observé chez diverses bactéries à Gram positif. Les mécanismes d'acquisition de la résistance à la nisine sont complexes et peuvent différer d'une souche à l'autre, ceux-là ont été présentés par Zhou et *al.*, (2013).

Ainsi cette résistance à la nisine a été mise en évidence par plusieurs études, d'ailleurs, Harris et *al.*, (1991) ont démontré la résistances chez certains types de bactéries telle que *Streptococcus thermophilus*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus spp.*, cette résistance est liée à la production d'une enzyme, la nisinase qui est une didéhydroalanine réductase et qui désactive la nisine et la subtiline. Cette résistance est aussi liée à la rigidité des membranes bactérienne et à leur faible taux de lipides chargés négativement (Crandell et Montville, 1998).

La sensibilité de la bactérie cible, le milieu de croissance utilisé, la concentration d'agar du milieu testé, ainsi que la concentration en bactériocine sont tous des facteurs pouvant affecter les résultats, donc selon Meghrous et *al.*, (1999), l'estimation de l'activité d'une bactériocine par la méthode de diffusion dans l'agar est une mesure relative.

5. Résultats du test de l'effet antibactérien de la combinaison (huile essentielle + nisine) à différentes concentrations sur les souches bactériennes testées

- 25% de l'huile +75% de la nisine;
- 50% de l'huile + 50% de la nisine;
- 75% de l'huile +25% de la nisine.

➤ Effet de la combinaison sur *Bacillus cereus*

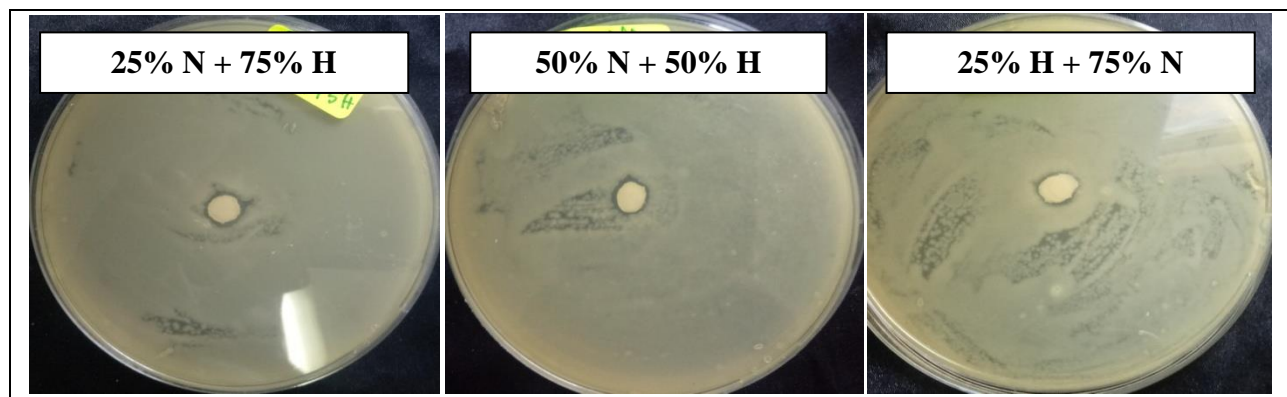


Fig. 15: Effet de la combinaison de l'HE et la nisine à différentes concentrations sur *Bacillus cereus*.

➤ Effet de la combinaison sur *Escherichia coli*

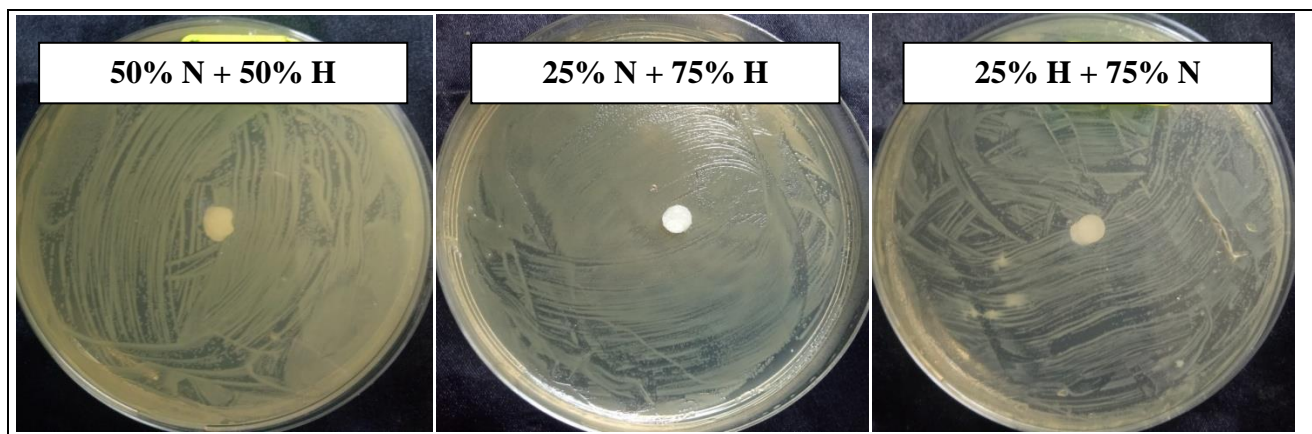


Fig. 16: Effet de la combinaison de l'HE et la nisine à différentes concentrations sur *Escherichia coli*.

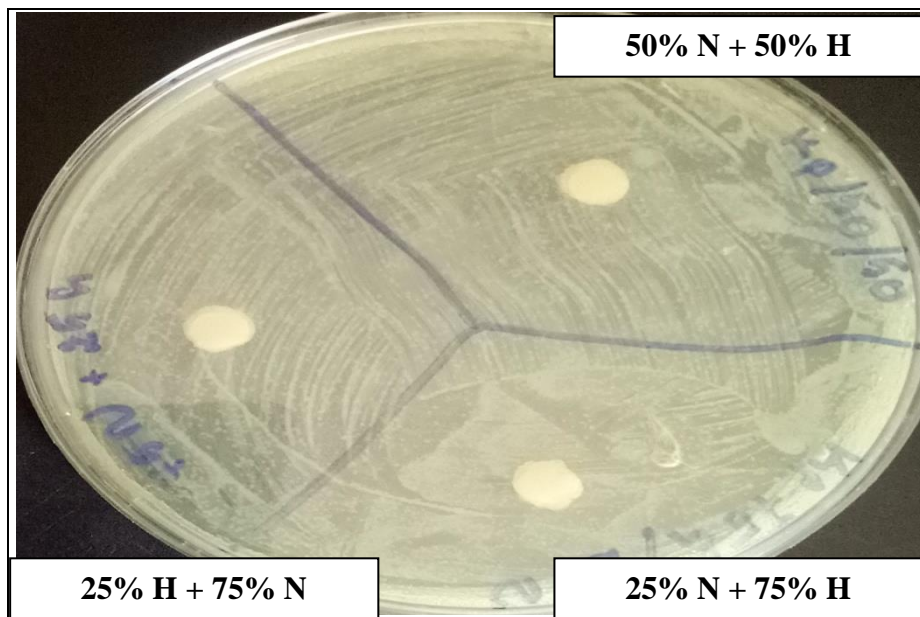
➤ Effet de la combinaison sur *klebsiella pneumoniae*

Fig. 17: Effet de la combinaison de l'HE et la nisine à différentes concentrations sur *klebsiella pneumoniae*.

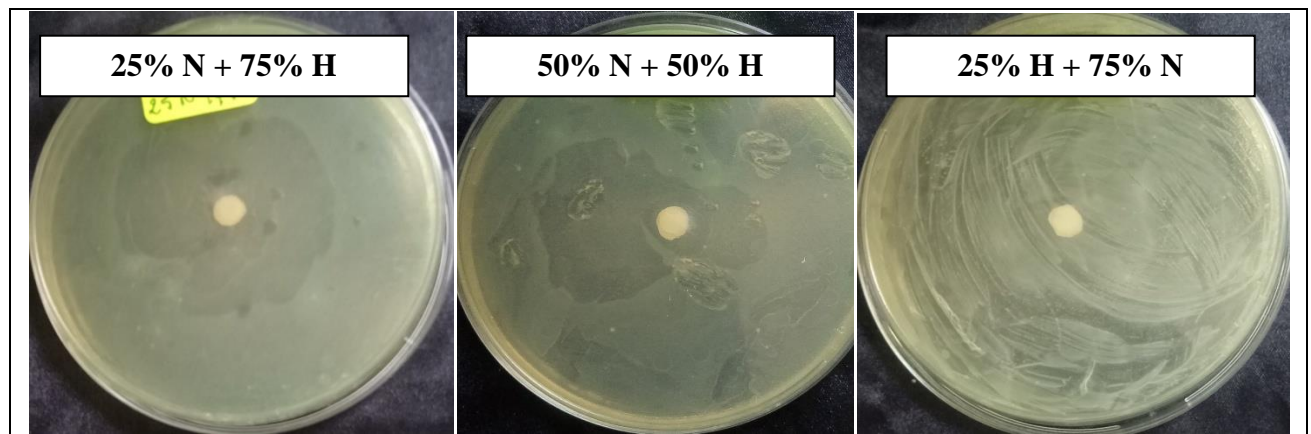
➤ Effet de la combinaison sur *Pseudomonas aeruginosa*

Fig. 18: Effet de la combinaison de l'HE et la nisine à différentes concentrations sur *Pseudomonas aeruginosa*.

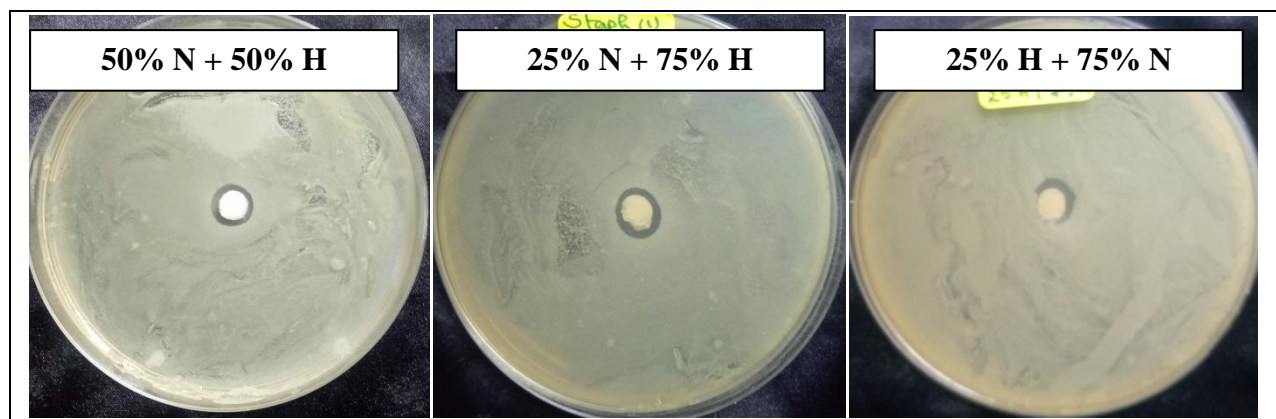
➤ Effet de la combinaison sur *Staphylococcus aureus* MV50

Fig. 19: Effet de la combinaison de l'HE et la nisine à différentes concentrations sur *Staphylococcus aureus* MV50.

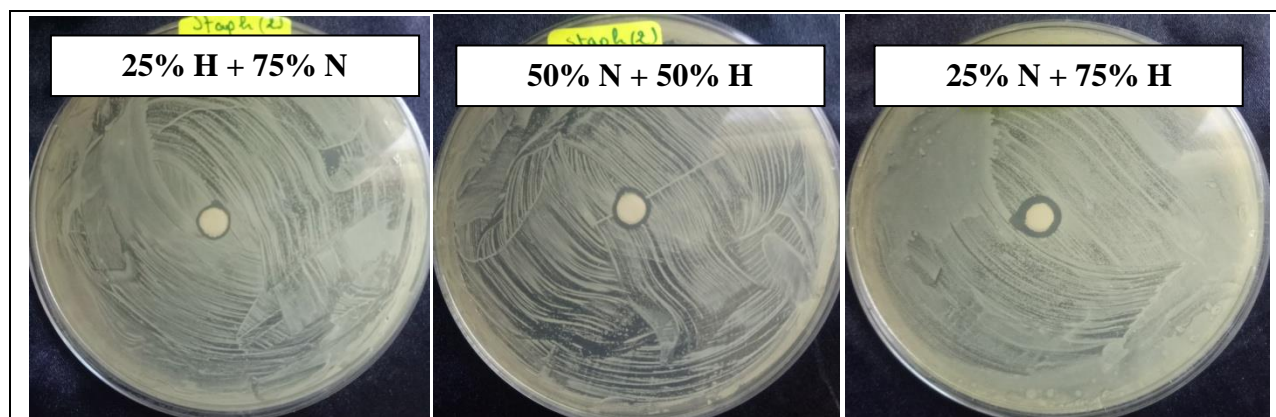
➤ Effet de la combinaison sur *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Fig. 20: Effet de la combinaison de l'HE et la nisine à différentes concentrations sur *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Les diamètres des zones d'inhibition ainsi que la sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis de la combinaison de l'HE et la nisine à différentes concentrations sont résumés dans le tableau suivant:

Tableau XI: Tableau récapitulatif des résultats de la combinaison entre la nisine et l'huile essentielle à trois concentrations différentes sur les six bactéries testées.

% de combinaisons Souches	Diamètres d'inhibition en (mm) et en moyenne \pm écart type		
	<i>Cedrus atlantica</i> + Nisine		
	25% H + 75% N (a)	50% N + 50% H (b)	25% N + 75% H ©
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	06,00 \pm 0,00	06,00 \pm 0,00	06,00 \pm 0,00
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 72853)	06,00 \pm 0,00	06,00 \pm 0,00	06,00 \pm 0,00
<i>S.aureus</i> (ATCC 25923)	08,00\pm01,00	08,50\pm0,50	06,00 \pm 0,00
<i>S.aureus</i> (MV 50)	10,00 \pm 01,00	10,00 \pm 0,00	10,50 \pm0,50
<i>B.cereus</i> (ATCC 14579)	08,50\pm0,50	08,50\pm0,50	10,50\pm01,50
<i>K.pneumoniae</i> (KP 700603)	06,00 \pm 0,00	06,00 \pm 0,00	06,00 \pm 0,00

Ces combinaisons réalisées dans notre étude, sont dans le but de déduire la présence des différents effets antibactériens (synergique, antagoniste, indifférent et additif) envers les six souches testées, cette activité est déterminée *in vitro* par la méthode de diffusion sur gélose en mesurant les diamètres des zones d'inhibition autour des disques en (mm).

Le tableau ci-dessus montre les résultats de l'activité de la combinaison de l'HE de *Cedrus atlantica* avec la nisine sur les bactéries testées. D'après les résultats obtenus, les 3 combinaisons HE-nisine présentent un faible effet antibactérien sur certaines souches bactériennes testées, *S. aureus* MV 50, *B. cereus* ATCC 14579 et *S. aureus* ATCC 25923 avec des zones d'inhibition variantes entre 08,50 mm et 10,50 mm, et aucun pouvoir inhibiteur contre *E. coli*, *P. aeruginosa* et *K. pneumoniae*.

De plus, nous avons constaté que les différentes concentrations de combinaisons en HE et nisine ont eu des effets dissemblables envers les souches microbiennes testées. Les trois combinaisons HE+nisine exercent un effet antibactérien indifférent envers 3 souches bactériennes testées, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*. Tandis qu'elles exercent un effet antagoniste vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Par ailleurs, ces combinaisons produisent un effet antibactérien additif envers *Staphylococcus aureus* MV 50. Les combinaisons 25% huile + 75% nisine et 50% huile + 50% nisine exercent un effet antagoniste envers *B. cereus* et indifférent pour 75% nisine + 25% huile.

En comparant les résultats de la combinaison avec ceux obtenus avec l'HE et la nisine seules, nous pouvons déduire que l'effet de l'huile essentielle de cèdre de l'atlas sur *P. aeruginosa*, *S. aureus* ATCC 25923 et *B. cereus* est bien meilleurs que ceux obtenus avec la combinaison.

Généralement, il est bien admis que les composés majeurs d'une HE donnée reflètent souvent son activité biologique (Ipek et al., 2005), l'efficacité et les différences de leurs activités dépendent de leurs concentrations dans le milieu en présence d'autres composés minoritaires.

Cependant, les actions synergiques entre les molécules issues de différentes HEs en comparaison avec l'action individuelle d'un ou plusieurs composés et leur sélectivité envers certaines bactéries restent jusqu'à présent mal élucidées. Pour cela, il serait possible que l'activité d'une molécule majoritaire soit modulée par d'autres molécules minoritaires (Hoet et al., 2006) ce qui peut bien expliquer nos résultats trouvés vis-à-vis de ces dernières.

Selon l'étude de Rhayour et al., (2002) sur le mécanisme d'action des HEs des clous de girofle et d'origan (*Origanum vulgare*) simultanément avec ceux de deux de leurs composants, le thymol et l'eugénol vis-à-vis de *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*, les deux HEs tout comme leurs deux composants ont été capables d'induire une lyse cellulaire. Cela induit la libération de substances associées à la rapide mortalité bactérienne.

De même, l'étude de Mahmoud et al. (2004), suggère que l'effet antimicrobien qu'exercent les HEs pourrait être expliqué par la destruction de certains systèmes enzymatiques incluant ceux qui participent dans la production d'énergie cellulaire et la production des composés structuraux. Guesmi et Boudabous (2006) quant à eux, ont avancé l'hypothèse d'inactivation et de destruction du matériel génétique.

L'effet synergique résultant de la combinaison des huiles essentielles avec d'autres agents antimicrobien est souvent étudié par plusieurs auteurs, Kalpna et Chanda (2012), ont enregistré une amélioration importante dans l'activité grâce aux combinaisons réalisées entre les HEs et les antibiotiques dont l'effet le plus marqué était avec *Carica papaya* associée aux différents antibiotiques, dont cette huile n'a exercée aucun effet antibactérien.

Dans la même démarche d'étude, le test de la combinaison de 50% d'HE de *D'Urtica dioïca* et 50% de nisine réalisé par Arab et al., (2012) a montré un effet synergétique vis-à-vis

de *Klebsiella oxytoca*. Par contre, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* ont été indifférentes aux combinaisons 25 % HE de *Urtica dioïca* + 75 % nisine et 25 % HE de *Ruta tuberculata* + 75 % nisine, respectivement.

Stevens et *al.*, (1991), ont rapporté que la nisine inhibe la croissance des bactéries Gram négatif quant elles sont traitées simultanément avec l'agent chélateur EDTA.

Akroun et Harrani (2011), ont testé 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 d'*E. Coli* d'un diamètre de 15,33 à 37 mm et de 10 à 20 mm respectivement. Ainsi, l'application de l'oleuropéine associée à la nisine a montrée une forte sensibilité de *S. aureus* (35 mm) et d'*E. coli* (32 mm) comparée aux diamètres de l'oleuropéine seule.

Contrairement à nos résultats, Ouelhadj et *al.*, 2017, ont enregistré un effet antibactérien synergique en combinant l'HE extraite des feuilles de *Pelargonium asperum* et la nisine sur les souches bactériennes testées. De même, les résultats obtenus en testant l'HE de *pelargonium asparum* qui s'est montrée active contre les souches bactériennes testées.

Une autre étude réalisée par Halwani (2009) a montrée aussi que l'utilisation de Thymoquinone et de thymohydroquinone de *Nigella sativa*, associées à la cephalexine donne des interactions synergiques contre *E. coli* (G-), ces même composés ont montrés des effets antagonistes et indifférents en association avec d'autres antibiotiques. La combinaison de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* de Turquie avec la cephaloxitine et le ceftriaxone étudiée par Torglu (2011) a montré également des effets antagonistes sur *E. coli*.

Les activités variables observées avec les différentes huiles (synergie, antagonisme et indifférence), peuvent être expliqués par le mode d'action des composés de l'HE, ceux-là ne réagissent pas de la même manière en les combinant avec la bactériocine testée.

Galucci et *al.* (2006) ont rapporté dans leur étude que l'utilisation des terpènes combinés avec la pénicilline a pu augmenter l'activité de ces dernières contre des souches bactériennes à Gram négatif en leur conférant une meilleure capacité de transport à l'intérieur de la cellule bactérienne cible. D'une autre part, Rosato et *al.* (2010) ont attribué l'activité synergique entre la gentamicine et les huiles essentielles de *Pelargonium graveolens* et d'*Aniba rosaeodora* contre les Gram négatif aux alcools terpéniques, qui sont les composants

majoritaires de ces deux huiles et qui interagissent avec la membrane cytoplasmique bactérienne ce qui facilite la pénétration de la gentamicine à l'intérieur de la cellule et sa fixation à la sous unité 30 S du ribosome.

En outre, les travaux de Balouiri et *al.*, (2017) sur l'effet de la combinaison entre l'huile essentielle du géranium d'Egypte (*Pelargonium asparum*) et celle de la Camomille sauvage (*Ormenis mixta*), a montré un effet synergique entre ces deux huiles essentielles qui pourraient s'expliquer par la capacité des monoterpènes et sesquiterpènes, qui sont les principaux composés de l'HE de *Cedrus atlantica* d'intégrer et perturber la membrane cellulaire, et donc, l'absorption des terpénoïdes actifs (citronnellol, geraniol, citronellyl ester et isomenthone.

6. Résultats de la concentration minimale inhibitrice

L'activité antibactérienne de l'HE de *Cedrus atlantica* sur les souches bactériennes testées a été confirmée par la méthode de macrodilution, présentant des valeurs de CMI proches de 7,90 et 51,69 $\mu\text{l/ml}$, respectivement pour *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) et *Bacillus cereus* (ATCC 14579). Les figures 21 et 22 illustrent les résultats de la CMI en milieu liquide (BHIB) de l'HE de cèdre sur les deux souches bactériennes à Gram positif.



Fig. 21: Séries de dilutions réalisées afin de déterminer la CMI en milieu liquide de l'HE de *Cedrus atlantica* sur la souche *Bacillus cereus*.

D'après la figure 21, la CMI de l'HE de *Cedrus atlantica* sur *Bacillus cereus* (ATCC 14579) est contenue dans le tube 1/4 qui est de 51,69 $\mu\text{l/ml}$.



Fig. 22: Séries de dilutions réalisées afin de déterminer la CMI en milieu liquide de l'HE de *Cedrus atlantica* sur la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

TP: Témoin positif.

TN: Témoin négatif.

SM: solution mère.

D'après la figure 22, la CMI de l'HE de *Cedrus atlantica* sur *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) est contenue dans le tube 1/16 qui est de 7,90 $\mu\text{l/ml}$.

Les HEs de nombreuses espèces du genre *Cedrus atlantica* sont connues pour leurs propriétés antibactériennes. Les résultats obtenus par les travaux de Derwich et *al.*, (2010) dans l'activité antibactérienne des huiles essentielles des feuilles de *Cedrus atlantica* de Maroc avec le test de diffusion sur disque d'agar ont démontrés que l'HE est active sur *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus intermedius*, *Enterococcus faecalis* et *Bacillus sp* avec des valeurs de CMI de 0,98 ; 0,68 ; 1,25 ; 1,31 et 1,62 respectivement.

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

- CMI < 50 $\mu\text{l/ml}$: pouvoir inhibiteur excellent ;
- 50 $\mu\text{l/ml}$ < CMI < 250 $\mu\text{l/ml}$: pouvoir inhibiteur intéressant ;
- 250 $\mu\text{l/ml}$ < CMI < 500 $\mu\text{l/ml}$: pouvoir inhibiteur faible ;

- CMI > 500 $\mu\text{l/ml}$: pouvoir inhibiteur nul.

Ces études rapportées dans la littérature scientifique sont en accord avec les effets antimicrobiens observés dans ce travail qui ont révélées que l'HE de cèdre possède un pouvoir inhibiteur excellent vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) et un pouvoir inhibiteur intéressant vis-à-vis de *Bacillus cereus* (ATCC 14579).

Selon Delaquis et al (2002), les activités antimicrobiennes des HEs sont difficiles à corréler 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.

7. Résultats de la concentration minimale bactéricide

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

La figure suivante, montre l'activité de l'HE de *Cedrus atlantica* sur *B. cereus* ATCC 14579:

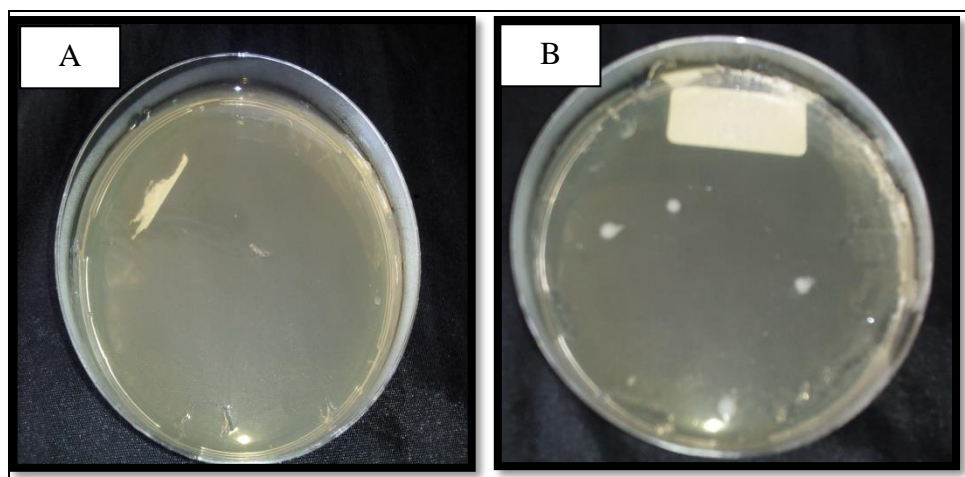


Fig. 23: Résultat de la CMB aux concentrations de 31,59 $\mu\text{l/ml}$ (A) et 15,84 $\mu\text{l/ml}$ (B) sur *Bacillus cereus*.

D'après la figure 23, on remarque un développement partiel de *Bacillus cereus* ATCC 14579 sur la boîte de Pétri (B), on déduit alors qu'à la concentration 15,84 $\mu\text{l/ml}$, l'huile de cèdre exerce un effet bactériostatique sur cette souche.

En revanche, à la concentration 31,69 $\mu\text{l/ml}$ (B), *Cedrus atlantica* exerce un effet bactéricide.

Ensuite la figure 24 qui suit, montre l'activité de l'HE de *Cedrus atlantica* sur la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 25923:

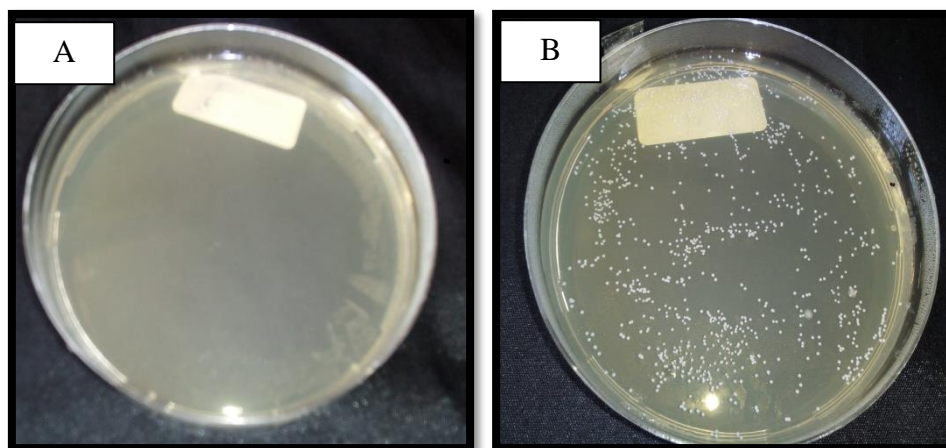


Fig. 24: Résultat de la CMB aux concentrations de 7,92 $\mu\text{l/ml}$ (A) et 3,16 $\mu\text{l/ml}$ (B) sur *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

D'après la figure 24, il ressort qu'il y a eu un léger développement de *S. aureus* ATCC 25923 sur la boîte Pétri (B), ce qui permet de conclure qu'avec la concentration 3,16 $\mu\text{l/ml}$, l'huile essentielle de cèdre exerce un effet bactériostatique sur cette souche, par contre, on remarque une absence totale de la croissance de *S. aureus* ATCC 25923 à la concentration 7,92 $\mu\text{l/ml}$ (A), on constate alors qu'à cette concentration, l'huile de cèdre d'Atlas exerce un effet bactéricide sur cette souche.

On constate alors, que pour un effet bactéricide sur toutes les souches testées, la concentration de l'HE doit être un peu élevée.

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

Les résultats de Rhafouri et *al.*, (2014), ont démontrés que l'huile essentielle des graines de cèdre de l'atlas a manifestée diverses caractéristiques antibactériennes et

antifongiques selon les microorganismes. En effet, les tests antibactériens des deux huiles ont montrés que seule *E. coli* était sensible et inhibée à la concentration de 1/100 v/v.

Les résultats obtenus dans l'étude de Zrira et Ghanmi (2016), montrent que l'huile essentielle de *Cedrus atlantica* est inactive contre *Salmonella* et *S. aureus*. Par contre, une activité inhibitrice est enregistré contre *E. coli*, *Bacillus subtilis* et *Bacillus cereus* et a montrée des valeurs de CMI de 0,4µl/ml, 0,2µl/ml et 0,4µl/ml, respectivement. L'activité antibactérienne de ce type d'huile de cèdre est relativement différente de celle d'autres huiles essentielles de *Cedrus atlantica*. Aberchane et *al.*, ont montré des valeurs de CMI de 4µl/ml pour *E. coli*, 2µl/ml pour *Bacillus subtilis* et 10µl/ml pour *S. aureus*.

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

Vigneau a démontré que l'activité antibactérienne présente dans l'huile essentielle est principalement due aux alcools terpéniques (13,01%). Les hydrocarbures monoterpéniques et les terpènes ont également montrés des propriétés antimicrobiennes qui semblent avoir une activité modérée contre les bactéries Gram positif.

Les valeurs obtenues étaient plus ou moins comparables à d'autres études, ces différences peuvent êtres dues à la méthodologie suivi, à l'état physiologique des souches ainsi la composition de l'HE utilisée.



Conclusion et perspectives

La présente étude nous a permis d'évaluer l'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'une plante aromatique, *Cedrus atlantica*, sur six souches bactériennes de références (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* MV50, *Staphylococcus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* et *Klebsiella pneumoniae*) et l'effet de son association avec la nisine.

L'huile essentielle de *Cedrus atlantica* a manifestée le plus grand pouvoir antibactérien avec des zones d'inhibition de $24,75 \pm 4,38$ mm pour *staphylococcus aureus* ATCC 25923, $13,75 \pm 1,29$ mm pour *Bacillus cereus* et $13 \pm 2,12$ mm pour *Pseudomonas aeruginosa*. Par contre, cette huile a montrée des zones d'inhibition plus ou moins faible vis-à-vis des autres bactéries testées. D'autre part, les résultats nous indiquent que la nisine n'est pas active sur les souches testées mis-à-part *S. aureus* ATCC 25923 et *B. cereus* avec des zones d'inhibition assez faible.

L'huile de cèdre s'est montrée bactéricides contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Bacillus cereus*, avec des concentrations de CMI jugées excellente pour *S. aureus* et intéressante pour *B. cereus*.

Une étude plus poussée de l'activité antibactérienne qui porte sur la combinaison de l'huile essentielle et la nisine, a révélée des effets dissemblables envers les souches bactériennes testées; indifférent envers: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*, tandis qu'elle exerce un effet antagoniste vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Par ailleurs, ces combinaisons produisent un effet antibactérien additif envers *Staphylococcus aureus* MV 50. Les combinaisons 25% huile + 75% nisine et 50% huile + 50% nisine exercent un effet antagoniste envers *B. cereus* et un effet indifférent pour la combinaison 75% nisine + 25% huile.

Subséquemment, nous pouvons conclure que l'utilisation de cette huile seule a un effet plus considérable que son utilisation en combinaison avec la nisine.

A l'essor de la présente étude, il serait intéressant de mener une étude plus approfondie sur l'huile essentielle du Cèdre d'Atlas et son potentiel synergiques avec d'autres agents antimicrobiens. Dans le but de poursuivre ce travail et dans la perspective de tendre vers une nouvelle génération de plates formes intégralement saines, il serait donc nécessaire:

- D'étudier son potentiel synergique avec d'autres agents antimicrobiens ou molécules d'origine microbienne afin d'améliorer son activité.
- D'élargir son panel des activités biologiques par d'autres tests: antioxydant, anti-inflammatoire et anticoagulant.
- D'approfondir les recherches sur une large gamme de souches microbiennes.
- De tester son activité antifongique en combinaison avec la nisine.
- Isoler les molécules bioactives.

Références bibliographiques

Abee T., Krockel L., et Hill C., (1995). Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *International Journal of Food Microbiology*, 28(2), 169–185. doi:10.1016/0168-1605(95)00055-0.

Aberchane M., Satrani B., Fechtal M. et Chaouch A., (2003). Effet de l'infection du bois de Cèdre de l'Atlas par *Trametes pini* et *Ungulina officinalis* sur la composition chimique et l'activité antibactérienne et antifongique des huiles essentielles. *Acta Botanica Gallica*, 150:2, 223-229, DOI: 10.1080/12538078.2003.10515420.

Aberchane M., Fechtal M., Chaouch A., (2004). Analysis of Moroccan Atlas Cedarwood Oil (*Cedrus atlantica* M), *Journal of Essential Oil Research*.16:542-54.

Aberchane M., Fechtal M., Chaouch A., El Abid A., (2006). Effet de l'infection du bois de cèdre de l'Atlas (*Cedrus atlantica* M.) par les champignons *Trametes pini* et *Ungulina officinalis*. *Acta Botanica Galica*, 150: 2, 223-229, DOI: 10.1080/12538078.2003.10515420.

AFNOR NF T-75-001 « Huiles essentielles ». Paris, France.

AFNOR NF T-75-002 « Huiles essentielles ». Paris, France.

AFNOR, (2000). Recueil de normes: les huiles essentielles. Tome1. *Echantillonnage et méthodes d'analyse*. AFNOR, Paris, 440.

AIT BAZIZ H., CHEMALI A., (2017). Evaluation de l'activité antioxydante et de l'activité antimicrobienne de l'extrait méthanolique d'une plante médicinale locale. (Mémoire de master en pharmacologie moléculaire, université A. MIRA, Bejaia).

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

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. (Mémoire d'ingénieur d'État. Université Mouloud-Mammeri Tizi-Ouzou), Algérie.

Al-Fatlawi A. A., (2018). Anti-Proliferative and Pro-Apoptotic Activity of Carvacrol on Human Cancer Cells. Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Jabir ibnHayyan Medical University, Najaf, Iraq.

Amara N., Boughérara Y., (2017). Activité antibactérienne de l'huile essentielle du Cyprés vert (*Cupressus Sempervirens* L.). *Algerian Journal of Natural Products*. 5(2): 455-462.

Amarti F., Satrani B., Aafi A., Ghanmi M., Farah A., Aberchane M., El Ajjouri M., ElAntry S. et Chaouch A., (2010). Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* et *Thymus ciliatus* Benth du Maroc. 14, 141-148.

Anton R., Lobstein A., (2005). Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Tec & Doc, Paris, 522.

Arab L., Oudafal N., Ould L'Hadj T., (2012). Étude in vitro de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Ruta tuberculata*, *Ocimum basilicum* L. et *Urtica dioica* en combinaison avec la nisine sur des souches bactériennes pathogènes. Mémoire d'ingénieur d'État. Université Mouloud-Mammeri, Tizi-Ouzou, Algérie.

Asaduzzman S. M., SONOMOTO K., (2009). Lantibiotics: diverse activities and unique mode of action. *Journal of biosciences and bioengineering*. 475-487.

Attou A., (2011). Contribution à l'étude phytochimique et activités biologique des extraits de la plantes *Ruta Chalpensis* (Fidjel) de la région d'Ain Témouchent. (Mémoire Magistère en biologie, université ABOU BEKR BELKAID, Tlemcen). 19-23.

Avlessi F., Dango J., Wotto V.D., Alitonou G.A., Sohounhloue D.K. et Menut C., (2004). Propriétés antioxydantes de l'huile essentielle des feuilles de *Clausena anisata* (Wild) Hook. Comptes Rendus Chimie. Vol. 7, n° 10-11: 1057-1061. Doi : 10.1016/j.crci.2003.11.015.

Balouiri M., Sadiki M., Ouedehiri W., Farah A., Abed S., Koraichi S. I., (2014). Antibacterial activity of extracts from *Salvia officinalis* and *Rosmarinus officinalis* obtained by sonication and maceration methods. *International Journal of Pharmacology Science*, 6:167-170.

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

Bekhechi C., Abdlouahid D., (2010). Les huiles essentielles. 20.

Belaiche P., (1979). L'aromatogramme. Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. M.S.A. Editeur, Paris. Tome 1, 204.

Belhadj S.F.K., Slim B.A., Aouni M., Harzallah S.F., Mahjoub M.A., Mighri Z., Chanmont J.P., (2010). Activité antivirale et antioxydante *in vitro* d'huile essentielle de *Thymus capitatus* L., *Hoffmans et link* de Tunisie. *Acta Botanica Gallica*. 157(3): 433-444.

Belkou H., Beyoud F., Taleb Bahmed Z., (2005). Approche de la composition biochimique de la menthe verte (*Menthe spicata* L) dans la région de Ouargla (mémoire DES, université Ouargla). 2-61.

Benmouna Z., (2012). Bactériocines des bactéries lactiques: étude biochimique et génétique. (Thèse de magister en biotechnologie, université d'Oran, faculté des sciences, département de biotechnologie).

Benoit M. N., Gassoum, Aboubakar S., Guy H. D., Fendoug, (2010). Encapsulation par coacervation complexe d'huile essentielle et d'oléorésine de Rhizome de gingembre (*Zingiber officinale* Roscoe) du Cameroun. (Thèse de l'université Laval Québec Canada).

Benzeggouta N., (2005). *Etude de l'Activité Antibactérienne des Huiles Infusées de Quatre Plantes Médicinales Connues comme aliments.* (Thèse Magister de l'université Mentouri de Constantine, Institut de chimie).

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

Bernard T., Periau F., Bravo p., Delmas M., Gaset A., (1988). Extraction des huiles essentielles. Chimie et Technologie. Information chimie. N°298, 179.

Besombes C., (2008). Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermomécanique d'herbes aromatiques, Applications généralisées. (Thèse Doctorat, Université de La Rochelle). 41-45.

Bouamer A., Bellaghit M., Mollay A., (2004). Etude comparative entre l'huile essentielle de la menthe verte et la menthe poivrée de la région d'Ouargla. (Mémoire DES .Université Ouargla). 2-5; 10; 19; 21-22

Bouanane N., Boussehl N., (2005). Contribution agroécologique aux essais d'introduction de la menthe poivrée (*menthe piperata* L) dans la région de Ouargla en vue de l'utilisation des ses huiles essentielles en thérapie. (Mémoire Ingénieur, Université d'Ouargla). 22-23 ; 28.

Boudy P., (1950). Economie forestière Nord-Africaine: monographie et traitement des essences forestières. Édition: Larose, T2. 529-619.

Boudy P., (1952). Guide du forestier en Afrique du Nord. Édition : La Maison Rustique. 505.

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

- Bourkhiss, M., Hnach M., Bourkhiss B., Ouhssine M. et Chaouch A., (2000).** Composition chimique et propriétés antimicrobiennes de l'huile essentielle extraite des feuilles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) du Maroc. *African Science*. 3: 232–242.
- Bousbia N., Albert Vian M., Ferhat M. A., Meklati B. Y., Chemat F., (2009).** A new process for extraction of essential oil from Citrus peels. *Journal of Food Engineering*, 9 (3), 409 - 413.
- Bouyahya A., Abrini J., Bakri Y., Dakka N., (2016).** Essential Oils as Anticancer Agents: News on Mode of Action. Lavoisier SAS. DOI: 10.1007/s10298-016-1058-z.
- Boyle W., (1955).** Spices and essential oils as preservatives. *The American Perfumer and Essential Oil Review*, 66, 25–28.
- Boziaris I. S., Adams M. R., (1999).** Effect of chelators and nisin produced in situ on inhibition and inactivation of Gram negatives. *International Journal of Food Microbiology*, 53, 105-113.
- Breitmaier P. D. E., (2006).** *Terpenes: Flavors, Fragrances, Pharmaca, Pheromones*. Tec & Doc, Lavoisier. Weinheim, Germany.
- Brian M.L., (1995).** The isolation of aromatic materials from plant products. *Reynolds Tobacco Company*. Winston-salem (USA). 57-148.
- Bruneton J., (1993).** Pharmacognosie. phytochimie, plantes médicinales. Tec & Doc, Lavoisier, Paris. 915.
- Bruneton J., (1997).** Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales, 2ème édition. Tec & Doc éditions. Paris. France.
- Bruneton J., (1999).** Pharmacognosie: Phytochimie, Plantes Médicinales. 3^{ème} Edition, Tec et doc, Paris. 484-540.
- Buckle J., (1997).** Clinical aromatherapy, essential oils in practice. 2^{ème} edition, United States of America.
- Burt S., (2004).** Essential Oils: Their Antibacterial Properties and Potential Application in Foods. *International Journal of Food Microbiology*. 94: 223-253.
- Carette A. S., (2000).** La lavande et son huile essentielle. (Thèse de doctorat, Université de Toulouse). 100.
- Carniero A. M. S., Cassar C. A., Miles R. J., (1998).** Trisodium phosphate increases sensitivity of Gram-negative bacteria to lysozyme and nisin. *Journal of Food Protection*, 61(7), 839-844.

Carson C. F., Mee B. J., Riley T. V., (2002). Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46, 1914–1920.

Chaker E.K., (2010). Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées. (Thèse de Doctorat université de Toulouse), 70-71.

Cho J.S., Kim T.H., Lim J.-M., Song J.-H., (2008). Effects of eugenol on Na⁺ currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Research*, 1243, 53–62.

Cintas L. M., Casaus M. P., Herranz C., Nes I. F. et Hernández P. E., (2001). Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Food Science and Technology International*. 7: 281. DOI: 10.1106/R8DE-P6HU-CLXP-5RYT.

Cox S.D., Gustafson J.F., Warmington J.R., Wyllie S.G., (1991). *In vitro* antimicrobial activity and chemical composition of *Malaleuca alternifolia* essential oils. *Journal of Applied Microbiology* .88, 170-175.

Cox S. D., Mann C. M., Markham J. L., Bell H. C., Gustafson J. F., Warmington J. R., Wyllie S. G., (2000). The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Malaleuca alternifolia* (tee tree oil). *Journal of Applied Microbiology*. 88, 170-175.

Crandall A. D., Montville T. J., (1998). Nisin resistance in *Listeria monocytogenes* ATCC 700302 is a complex phenotype. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(1):231-7.

Dapkevicius A., Venskutonis R., Van Beek T.A., Linssen J.P.H., (1998).Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *Journal of Science Food and Agriculture*. 77(1), 140-146.

De Aruaz L. J., Faustino Jozala A., Gava Mazzolab P., Vessoni Penna T. C., (2009). Nisin biotechnological production and application: a review. Elsevier. *Trends in Food Science and Technology*. 20: 146-154.

Deegan L. H., Cotter P. D., Hill C., Ross P., (2006). Bacteriocins: Biological tools for biopreservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal*, 16, 1058-1071.

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

Delaquis P. J., Stanick K., Girard B., et al., (2002). Antimicrobial activity of individual and mixed fraction of Dill, Cilantro, Coriander and Eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 74:101–9.

Delves-Broughton J., (1990). Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technol.* 44: 100-113.

De Oliveira D.H., Bork Abib P., Xavier Giacomini R., João Lenardão E., Schiedeck G., Ethel A. Wilhelm, Luchese C., Savegnago L. & Guimarães Jacob R., (2018). Antioxidant and antifungal activities of the flowers essential oil of *Tagetes minuta*, (Z)- tagetone and thiotagetone. *Journal of Essential Oil Research.* 160-169.

Derwich, E., Benziane Z. et Boukir A., (2010). Chemical composition and *In vitro* antibacterial activity of the essential oil of *Cedrus atlantica*. *International Journal of Agriculture Biology*, 12: 381–385.

De Vuyst L. et Vandamme E.J., (1994). Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*: properties, biosynthesis, fermentation and applications. In: *Bacteriocins of lactic acid bacteria. Balackie Academie and Professional*, Glasgow. 151-221.

Djabou N., Lorenzi V., guinoiseau F., Andreani S., Guiliani M. C., Desjobert J. M., Bolla J. M., Costa J., Berti L., Luciani A., Muselli A., (2013). Phytochemical composition of Corsican Teucrium essential oils and antibacterial activity against food borne or toxiinfection patogens. *Food Control.* 30: 354-363.

Dugo G. A., Di Giacomo T. et Francis, (2002). The genus *Citrus*. *Publishing, London*.

El Haib A., (2011). *Valorisation de terpènes naturels issus de plantes marocaines par transformations catalytiques.* (Thèse de doctorat, université de Toulouse).

El Malki F., Eddaraji K., Alloudane R., Greche H., Essalmani H., Barrijal S., (2018). Antimicrobial activity of essentials oils extracted from leaves of native Moroccan plants against clinical bacterial isolates. *The International Arabic Journal of Antimicrobial Agents.* Vol. 8 N°1:4: 2174-9094. Doi: 10.3823/819.

El Moualdi L., Labioui H., Boushama L., et al., (2008). Activité bactéricide d'une souche de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Bulletin de la Société de Pharmacie, Bordeaux*, 147:7–18.

Emberger L., (1998). *Contribution à la connaissance des Cèdres et en particulier du Deodora et de Cèdre de l'Atlas.* *Bol. S.E.A.* 24, 107.

Fantino N. S., (1990). Etude du polymorphisme d'une population de lavande (*Lavandula angustifolia* Mill.)- Détermination de critères précoces de sélection. (Thèse de doctorat. Université de La Rochelle). 41-45.

Fekih N., (2014). Propriétés chimiques et biologiques des huiles essentielles de trois espèces du genre pinus poussant en Algérie. (Thèse de doctorats en Es-Sciences en chimie. Université Abou Bekr Belkaid. Tlemcen). 31.

Festy D., (2011). Les huiles essentielles ça marche ! Avec 78 formules à commander en pharmacie, LEDUC.S Edition, 22-26, ISBN: 978-2- 84899-316-4.

Fidah A., (2016). Etude de la durabilité de naturelle des bois de *cedrus atlantica* (manetti) et de *tetraclinis articulata* (VAHL) masters et évaluation de la bioactivité de leurs huiles essentielles sur les champignons *basidiomycetes lignivores*. (Thèse de doctorat, université Mohammed V, faculté des sciences. Rabat).

Fine D.H., (2010). Listerine: past, present and future – A test of thyme. *Journal of Dentistry* 38, S2–S5.

Gallucci N., Casero C., Oliva M., Zygadlo J. et Demo M., (2006). Interaction between terpenes and penicillin on bacterial strains resistant to beta-lactam antibiotics. *Molecular Medicinal Chemistry*. 10, 30-32.

Gausсен H., (1964). Les gymnosperms actuelles et fossiles. Travaux de Laboratoire Forestier, Toulouse, T. 2(1), fasc. VII.

Giordani R., Kaloustian J., (2006). Action anticandidosique des huiles essentielles: leurs concomitante avec des médicaments antifongique. *Phytotherapie*, N°3:121-124. DOI: 10.1007/s10298-006-0164-8

Girard G., (2010). Les propriétés des huiles essentielles dans les soins bucco dentaires d'hier à aujourd'hui. (Thèse de Doctorat en pharmacie, Université Henri Poincaré – Nancy1).

Guesmi A., Boudabous A., (2006). Activité antimicrobienne de cinq huiles essentielles associées dans les produits de thalassothérapie - les plantes à parfum, aromatiques et médicinales. Faculté des sciences de Tunis, université Tunis-El Manar, Tunisie.

Guignard J. L., (2000). *Biochimie végétal*. Paris, Edition: Dunod.

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

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

Hajji F., Fkih-Tetouani S., Tantaoui-Elaraki A., (1993). Antimicrobial activity of twenty one Eucalyptus essential oils. *Fitoterapia.*, 1: 71–78.

Halawani E., (2009). Antibacterial Activity of Thymoquinone and Thymohydroquinone of *Nigella sativa* L. and Their Interaction with Some Antibiotics. *Advances in Biological Research*, 3 (5-6): 148-152. ISSN 1992-0067.

Harkati B., (2011). Valorisation et identification structurale des principes actifs de la plantes de la famille Astraceae : *Scorzoner aundulata* (Thèse de l'université Mentouri – Constantine).

Hanlin M. B., Kalchayanand N., Ray P., Ray B., (1993). Bacteriocins of lactic acid bacteria in combination have greater anti-bacterial activity. *Journal of Food Protection*, 56, 252–255.

Harris L. J., Fleming H. P., Klaenhammer T. R., (1991). Sensitivity and resistance of *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, Scott A, and UAL500 to nisin. *Journal of Food Protection*, 54(11), 836-840.

Huang H. S., Chang L. H., Jong T. T., Nien Y. F., Chang C. M. J., (1995). Supercritical carbon dioxide extraction of turmetic oil from *Curcuma longa* Linn., and purification of turmerones. *Separation and Purification Technology*. 47, 119-125.

Hurst A., (1981). Nisin. *Advances in Applied Microbiology*, 27, 85–123.

Hoet S., Stevigny C., Herent M. F., et al., (2006). Anti-trypanosomal compounds from leaf essential oil of *Strychnos spinosa*. *Planta Medecine*, 72:480–2.

Ipek E., Zeytinoglu H., Okay S., et al., (2005). Genotoxicity and anti-genotoxicity of origanum oil and carvacrol evaluated by *Ames Salmonella*/microsomal test. *Food Chemestery*, 93:551–6.

Jack R. W., Tagg J. R., RAY B., (1995). Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Microbiologie Review*, 59, 17 1-20.

Kacher A. et Kedjar H., (2018). Evaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits des épines de *Cedrus atlantica* manetti. (Mémoire de master en pharmacotoxicologie, université A. MIRA, Bejaia).

Kalchayanand N., Hanlin M. B., Ray B., (1992). Sublethal injury makes Gram-negative and resistant Gram-positive bacteria sensitive to the bacteriocins, pediocin AcH and nisin. *Lettres de Microbiologie Appliquée*, 15: 219-243.

Kalemba D., Kunicka A., (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10, 813–829.

Kalpna R. et Chanda S., (2012). *In-vitro* interaction of certain antimicrobial agents in combination with plant extracts against some pathogenic bacterial strains. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1466–70.

Katla T., Møretrø T., Aasen I. M., Holck A., Axelsson L., Naterstad K., (2001). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold smoked salmon by addition of sakacin P and/or live *Lactobacillus sakei* cultures. *Food Microbiology*, 18(4), 431-439.doi:10.1006/fmic.2001.0420.

Kirmizibekmez H., Demirci B., Ye ilada E., Ba er K. H. C., Demirci F., (2009). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* growing wild in Turkey. *Natural Product Communications*, 4, 1001–1006.

Klaenhammer T. R., (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*.vol.12. 39-86.

Kleerebezem M., (2004). Quorum sensing control of lantibiotic production; nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis. *Peptides*. 25: 1405-1414.

Koba K., Sanda K., Raynaud C., Nenonene Y. A., Millet J., Chanmont J. P., (2004). Activités antimicrobiennes d'huiles essentielles de trois *Cymbopogon sp.* Africains vis-à-vis de germes pathogènes d'animaux de compagnie. *Annales de médecine vétérinaire*. 148: 202-206.

Ladaniya S.M., (2008). Citrus fruit biology, Technology and evaluation. Elsevier, 13-26.

Lagunez L. R., (2006). Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en thermomagnétique direct. (Thèse de l'institut national polytechnique de Toulouse), 38.

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

Laib I., (2011). Etude des activités antioxydantes et antifongique de l'huile essentielle des fleurs sèches de *lavenda officinalis* sur les moisissures des légumes secs. (Thèse Université Mentouri Constantine).

- Lambert R. J. W., Skandamis F. N., Coote P., Nychas G. J. E., (2001).** A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*. 91: 453-462.
- Legrand G., (1993).** Manuel de préparateur en Pharmacie. Masson, Paris.
- Lis-Balchin M., (2002).** Lavender: the *genus Lavandula*. *Taylor and Francis, London*: 37, 40, 50, 155-200.
- Liu, W. et Hansen J., (1990).** Some chemicals and physical properties of nisin, a small protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Applied of Environnement Microbiologie*. 56 : 2551-2558.
- Lubelski J., Rink R., khusainov R., Moll G. N., Kuipers O. P., (2008).** Biosynthesis, immunity, regulation, mode of action and engineering of the model lantibiotic nisin. *Cellular and Molecular Life Science*. 65 : 455-476.
- Lucchesi E., 2005.** Extraction sans solvant assistée par micro-ondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles. (Thèse de Doctorat de l'université de la réunion).
- Macchioni F., Cioni P.L., Flamini G., Morelli I., Ansaldi M., (2003).** Chemical composition of essential oils from needles, branches and cones of *Pinus pinea*, *P. halepensis*, *P. pinaster* and *P. nigra* from central Italy. *Flavour and Fragrance Journal*, 18: 139-134.
- Maffei M. et Sacco S., (1997).** Perfumer and flavorist. *Flavour and Fragrance Journal*. 13: 61.
- Mahfouf N., Bennadja S., Nasri H., Djahoudi A., Heni S., (2017).** Antioxidant and antibacterial activities of the essential oil of *Origanum vulgare* L. against *Escherichia coli* strains. *Researchgate*. 5: 1391-1399.
- Mahmoud B. S. M., Yamazaki K., Miyashita K., et al., (2004).** Bacterial microflora of carp (*Cyprinus carpio*) and its shelf-life extension by essential oil compounds. *Food Microbiology*. 21:657–66.
- Maisnier-Patin S., Tatini S. R., Richard J., (1995).** Combined effect of nisin and moderate heat on destruction of *Listeria monocytogenes* in milk. *Lait*. 75: 81-91.
- Makhloufi H., Saksouk M., Habib J., Chahine R., (2011).** Détermination de l'activité antioxydante du safran extraite de la fleur de *Crocus sativus* cultivée au Liban. *African Journal of Biotechnologies*. 10 (41): 8093–8100.

Mc Auliffe O., Ross R. P., Hill C., (2001). Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiologie Review.* 25 : 285-308.

Mebarki N., (2010). Extraction de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* et Application à la formulation d'une forme médicamenteuse-antimicrobienne. (Thèse de Magister, Université de M'hamed Bougara Boumardes). Edition: CNRS. Paris, 1170.

Meghrous J., Goulhen F., Lacroix C. (1999). Production of a nisin Z/pediocin mixture by pH-controlled mixed-strain batch cultures in supplemented whey permeates. *Journal Applied Microbiologie.* Vol.86. 399-406.

Mota-Meira M., Lapoite G., Lacroix C., Lavoix M. C., (2000). MICs of mutacin B-Ny266, Nisin A, vancomycin, and oxacillin against bacterial pathogens. *Antimicrobial Agents Chemother.* 44, 24-29.

Nikolic M., Jovanovic K., Markovic T., (2014). Chemical composition, antimicrobial, and cytotoxic properties of five Lamiaceae essential oils. *Industrial Crops and Products.* 61:225–32.

Ochoa- Hernandez L. R., (2005). Substitution de solvants et matières actives de synthèse par combine « solvant /actif » D'origine végétale. (Thèse de doctorat de l'institut National polytechnique de Toulouse).

Ogden K., Tubb, R. S., (1985). Inhibition of beer-spoilage lactic acid bacteria by nisin. *Journal of the Institute of Brewing.* 91: 390-392.

Ogden K. et Waites M. J., (1986). The action of nisin on beer-spoilage lactic acid bacteria. *Journal of the institute of Brewing.* 92: 463-467.

Oswald M., (2006). Détermination génétiques de la biosynthèse des terpinols aromatiques chez les la vigne. (Thèse université Louis Pasteur Strasbourg).

Ouelhadj A., Ait Salem L., Djenane D., (2017). Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Pelargonium x asperum* et son potentiel synergique avec la nisine. *Phytothérapie*, Lavoisier SAS. DOI 10.1007/s10298-017-1164-6.

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

Oussala M., Caillet S., Saucier L., (2006). Lacroix m-antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *pseudomonas putida* strain isolated from meat-meat science. *Journal of meat science.* 73: 236-244. Doi: 10.1016/j.meatsci.2005.11.019.

- Oyediji O., Afolayan A., (2005).** Comparative study of the essential oil composition and antimicrobial activity of *Leonotis leonurus* and *Locymifolia* in the Eastern Cape. *African Journal of Botanica*, 71: 114–116.
- Pibiri M. C., (2006).** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. (Thèse de Doctorat, Lausanne, suisse). 177.
- Pichersky E., Gershenzon J., (2002).** The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Current Opinion in Plant Biology*: 5, 237– 243.
- Pinchuk I., Shoval H., Dotan Y., Lichtenberg D., (2012).** Evaluation of antioxidants: Scope, limitations and relevance of assays. *Chemistry and Physics of Lipids*, 165: 638– 647.
- Piochon M. (2008).** Etudes des huiles essentielles d'espèce végétales de la flore laurentienne: composition chimique, activité pharmacologiques et hémisynthèse.
- Rhafouri R., Strani B., Zair T., Ghanmi M., Aafi A., El Omari M. et Bentayeb A., (2014).** Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of the *Cedrus atlantica* (Endl.) Manetti ex Carrière seeds essential oil. *Mediterranean Journal of Chemistry*. 3(5): 1027-1036.
- Rhayour K., (2002).** Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobactérium Phehei* et *mycobactérium fortntiun*. (Thèse de l'université sidi mohammed ben abdellah).
- Rhayour K., Bouchikhi T., Tantaoui-Elaraki A., et al., (2002).** The mechanism of bactericidal action of oregano and clove essential oils and of their phenolic major components in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Essential Oil Research*, 15:356–62
- Reisinger P., Seidel H., Tschesche H., Hammes W. P., (1980).** The effect of nisin on murein synthesis. *Archives of Microbiologie*, 127, 187-193.
- Riou-Nivert P., (2007).** Fiche extraite de la Flore forestière française. Région Méditerranéenne. *Forêt-entreprise*, 174(3): 14-16.
- Rios J. L., Recio M. C., (2005).** Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 100: 80–84.
- Rodney C., Kutchan T. M., Lewis G. N., (2000).** *Biochemistry and molecular biology of plants*.

Rollema H. S., Kuipers O. P., Both P., De Vos W. M., Siezen R. J. (1995). Improvement of solubility and stability of the antimicrobial peptide nisin by protein engineering. *Applied and environment microbiology*, 61: 2873-2878.

Rosato A., Piarulli M., Corbo F., Muraglia M., Carone A., Vitali M. E., Vitali C., (2010). In Vitro Synergistic Action of Certain Combinations of Gentamicin and Essential Oils. *Current Medicinal Chemistry*. 17, 3289-3295.

Saei-Dehkordi S. S., Tajik H., Moradi M., Khalighi-Sigaroodi F., (2010). Chemical composition of essential oils in *Zataria multiflora* Boiss. from different parts of Iran and their radical scavenging and antimicrobial activity. *Food and Chemical Toxicology* 48, 1562–1567.

Sahl, H. G., Kordel, M. et Benz M., (1987). Voltage-dependent depolarization of bacterial membranes and artificial lipid bilayers by the peptide antibiotic nisin. *Archives of Microbiology*, 149: 120-124.

SAHL H. G. et Bierbaum G., (1998). Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from gram-positive bacteria. *Annual review of microbiology*. vol.52. 41-79.

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

Sallé J.L. (1991), Les huiles essentielles, Synthèse d'aromathérapie, Edition: Frison-Roche. 167.

Sandri I. G., Zacaria J., Fracaro F., Delamare A.P.L., Echeverrigaray S., (2007). Antimicrobial activity of the essential oils of Brazilian species of the *genus Cunila* against foodborne pathogens and spoiling bacteria. *Food Chemistry* 103, 823–828.

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

Scimeca D., (2007). Les plantes du bonheur, Alpen, 12-17.

Schaffner W. (1993). Les plantes médicinales et leurs propriétés, Delachaux Niestlé.

Sharma N., Tripathi A., (2006). Fungitoxicity of *citrus sinensis* L essential oil on post-Harvest pathogens. *World journal of microbiological and biothechnology*, 587-593.

Sebiti I., (2002). Bio-emballage actif incorporant la nisine, diffusion de cette bactériocine en gel d'agarose. (Thèse de doctorat, université bordeaux). France.

Stein T., Heinzmann S., Solovieva I., Entian K. D., (2003). Function of *Lc. Lactis* nisin immunity genes nisI and nisFEG after coordinated expression in the surrogate host *Bacillus subtilis* *Journal of Biological Chemistry*. 278: 89-94.

Stevens K. A., Sheldon B. W., Klapes N. A., Klaenhammer T. R., (1991). Nisin treatment for inactivation of Salmonella species and other Gram-negative bacteria. *Applied of Environment Microbiology*, 57, 3613-3615.

Sutour S., (2010). Etudes de la composition chimique d'huiles essentielles et extraits de menthes de corse et de Kumquats. Chimie. Université de Corse.

Tajkarimi M. M., Ibrahim S. A., Cliver D. O., (2010). Antimicrobial herb and spice compound in food. *Food Control*, 21, 1199–1218.

Taleb M., (2004). Contribution à l'étude de *cedrus atlantica* manetti en fonction des caractéristiques situationnelles. Mémoire Ingénieur en Agronomie. I.N.A. El-Harrach. Alger, 81.

Tergos G., Stermitz F. R., Lomovskaya O., Lewis K., (2002). Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46, 3133–3141.

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

Thielmann J., Muranyi P., Kazman P., (2019). Screening essential oils for their antimicrobial activities against the foodborne pathogenic bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Heliyon*. Doi.org/10.1016/e01860.

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.

Toroglu S. (2011). *In-vitro* antimicrobial activity and synergistic/antagonistic effect of interactions between antibiotics and some spice essential oils. *Journal of Environmental Biology*. 32 (1), 23-29.

Toth J., (1980). Le cèdre III. La graine des plants en pépinière, reboisement, régénération naturelle. Forêt privée. *Revue Forestière*. Europe. N° 132. 41-47.

Toth J., (2005). Le cèdre de France. Etude approfondie de l'espèce. Paris, Biologie, Ecologie, Agronomie. L'Harmattan, 207.

Turtell A. et Delves-Broughton J., (1998). International acceptance of nisin as a food preservative. *International dairy federation bulletin*. 329: 20-23.

Unsicker S. B., Kunert G., Gershenzon J., (2009). Protective perfumes: the role of vegetative volatiles in plant defense against herbivores. *Current opinion in Plant Biology*: 12, 479–485.

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

Verzele L., Moudachirou S., Ramanoelina G., (1988). Perfumer and flavorist. *flavour and fragrance journal*. 13, 61-67.

Vigneau C., (1986). Plantes médicinales: Thérapeutique et toxicité. *Collection de médecine légale et de toxicologie médicale*, 129: 249-259.

Vila R., Santana A. I., Pérez-Rosés R., Valderrama A., Castelli M. V., Mendonca S., Zacchino S., Gupta M. P., Cañigueral S., (2010). Composition and biological activity of the essential oil from leaves of *Plinia cerrocampanensis*, a new source of α -bisabolol. *Bioresource Technology*. 101, 2510–2514.

Viuda-Martos M., Ruíz-Navajas Y., Fernández-López J., Pérez-Álvarez J. A., (2007). Chemical Composition of the Essential Oils Obtained From Some Spices Widely Used in Mediterranean Region. *Acta Chimica Slovenica*: 54, 921–926.

Voinchet V., Giraud-Robert A.M., (2007). Utilisation de l'huile essentielle d'hélichryse italienne et de l'huile végétale de rose musquée après intervention de chirurgie plastique réparatrice et esthétique. *Phytothérapie*. Springer. N°2: 67–72. DOI: 10.1007/s10298-007-0213-y.

Waikedre J., Dugay A., Barrachina I., Herrenknecht C., Cabalion P., Fournet A., (2010). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from New Caledonian *Citrus macroptera* and *Citrus hystrix*. *Chemistry & Biodiversity*: 7, 871– 877.

Wicht M. et Anton R., (1999). Plantes thérapeutiques. Edition: Tec & Doc. Paris, 635.

Wink M., (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 3-19.

Yesilada, E., Gurbuz I. and Shibata H., (1999). Screening of Turkish antiulcerogenic folk remedies for anti-*Helicobacter pylori* activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 66: 289–293

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

Zhou H., Fang J., Tian Y., Lu X. Y., (2013). Mechanisms of nisin resistance in Gram-positive bacteria. *Annals of Microbiology*, 64(2), 413-420. DOI: 10.1007/s13213-013-0679-9.

Zrira S. et Ghanmi M.,(2016). Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential of *Cedrus atlantica* (Cedarwood oil). *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 19:5, 1267-1272, DOI: 10.1080/0972060X.2015.1137499.

Annexes

Annexe: Composition des solutions et des milieux de culture utilisés

✓ **Eau physiologique stérile**

Composition en g/l :

Chlorure de sodium (Na Cl) 9g

Eau Stérile 1000ml

pH =7

Stérilisation à 120°C / 15min.

✓ **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/15min.

✓ **Gélose Muller Hinton (MH)**

Composition en g/l

Infusion de viande 2g

Hydrolysate acide de caséine 17,5g

Agar bactériologique 17g

Amidon soluble 1,5 g

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

Stérilisation à 120°C /15min.

✓ **Bouillon Brain Herat Infusion (BHIB)**

Composition en g/l

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

pH= 7

Stérilisation à 120°C/15 min.

✓ **Gélose Chapman**

Composition en g/l

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

pH= 7,4

Stérilisation à 120°C/15 min.

✓ **Gélose Hektoen**

Composition en g/l

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

pH = 7

Stérilisation à 120°C/15min.

✓ **Nisine**

Composition en g/l

HCL (0,02N)	100ml
Poudre de nisine	0,15g

Résumé

Ce travail porte sur l'étude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle (HE) de *Cedrus atlantica* et de la bactériocine: la nisine, seules et en combinaison contre six bactéries de références. L'activité antibactérienne *in vitro* a été évaluée par la méthode de diffusion sur gélose, et a révélée une activité antibactérienne significative exercée par HE vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (ATCC 14579) et *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 72853), avec des diamètres d'inhibition de 24.75; 13.75 et 13,00 mm, respectivement. Cependant, l'HE de *Cedrus atlantica* a montré une activité antibactérienne supérieure par rapport à la nisine. Or, Les valeurs des CMI rapportées dans cette étude sont comprises entre 7,92 – 31,69 µl/ml.

Les combinaisons réalisées entre HE et la nisine ont montré des effets dissemblables envers les souches (antagonistes et indifférents), par contre un effet additif a été enregistré à l'égard de *Staphylococcus aureus* (MV 50) avec 25% huile + 75% nisine et 50% huile + 50% nisine. Et aucune synergie n'a été enregistrée. En outre, les résultats de la CMB ont révélé un potentiel bactéricide de cette huile envers *S. aureus* (ATCC 25923) et *B. cereus* (ATCC 14579) avec des concentrations intéressantes.

L'utilisation de *Cedrus atlantica* comme agent antimicrobien, ainsi que sa combinaison avec d'autres produits naturels s'avère prometteuse pour la lutte contre l'antibiorésistance.

Mots clés : Huile essentielle : *Cedrus atlantica*, bactériocine, Nisine, activité antibactérienne, synergie, antagoniste, antibiorésistance.

Abstract

This work deals with this study, the antibacterial activity of the essential oil (EO) of *Cedrus atlantica* and bacteriocin: nisin, separately and in combination against six references bacteria. The *In vitro* activity was evaluated by the agar diffusion method, and showed significant antibacterial activity exerted by EO against *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (ATCC 14579) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 72853), with inhibition diameters of 24.75; 13.75 and 13 mm, respectively. However, EO of *Cedrus atlantica* showed a superior antibacterial activity compared to nisin. MIC values reported in this study range from 7.92 – 31.69 µl/ml.

The combinations made between EO and nisin showed a dissimilar effects on the strains (antagonists and indifferent), while an additive effect was recorded with *Staphylococcus aureus* (MV 50) with 25% oil + 75% nisin, and 50% oil + 50% nisin, respectively. And no synergy effect has been registered. In addition, the result of the CMB revealed a bactericidal potential of this oil against *S. aureus* (ATCC 25923) and *B. cereus* (ATCC 14579) with interesting concentrations.

The use of *Cedrus atlantica* as an antimicrobial agent, as well as its combination with others natural products are promising for the fight against antimicrobial resistance.

Key words: Essential oil, *Cedrus atlantica*, bacteriocin, nisin, antibacterial activity, synergy, antagonist, antimicrobial resistance.