

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

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



MEMOIRE

De fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de master académique

Filière : Biotechnologie

Spécialité : Biotechnologie microbienne

Thème

Evaluation de l'activité antimicrobienne des deux huiles essentielles
Zingiber officinale et *Rosmarinus officinalis* en combinaison avec la nisine.

Travail réalisé par :

Melle : NAAB DEHBIA

Melle : HADIBI SIHAM

Devant le jury :

PRESIDENT : Mr YAZID H

Maitre de conférence B à l'UMMTO

PROMOTEUR : Mr OUELHADJ A

Maitre de conférences A à l'UMMTO

EXAMINATRICE : Mme BENZAOUZ K

Maitre assistante A à l'UMMTO

Année universitaire : 2017/2018

Remerciements

Avant tout nous remercions " DIEU " tout puissant de nous avoir guidées tout au long de nos années d'études et de nous avoir donné le courage pour réaliser ce travail.

Nous tenant à exprimer nos remerciements les plus distingués :

A notre promoteur : Mr OUELHADJ Akli., maitre de conférences A à l'UNM70, qui a dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, pour ça bien vaillance, ses conseils, son aide moral et sa disponibilité pendant toute la période de travail.

A Mr YEZID H., Maitre de conférences B à l'UNM70, pour nous avoir fait l'honneur de présider nôtre jury

A Mme BENAZZOUZ K., maitre assistante A à l'UNM70, d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail.

Le personnel du laboratoire pédagogique de microbiologie de l'UNM70 de nous avoir soutenu et encouragé tout le long de notre travail.

A tous ceux qui ont contribués de près ou de lion à la réalisation de se mémoire.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

À mon très cher père, je lui dédie avec fierté ce mémoire qui reflète le fruit de l'éducation et de l'attention qu'il m'a tant réservé, je suis très reconnaissante. Merci **Papa**.

À la plus merveilleuse des mamans, qui ma supportée et s'est sacrifiée pour mon bonheur et m'a aidée dans les pires et meilleurs moments, car tu as toujours cru en moi. Merci **Maman**.

À mes frères et ma sœur : **Mohand, Ghani et Djoudja**

À mes **Cousins** et **Cousines** et toute ma **Famille**.

À mes collègues ainsi que mon binôme **Siham**.

À mes amis avec lesquels j'ai partagé mes meilleurs moments :

Hanane, Radia, Razika, Louwiza, Sassa, Dihia, Taous, Lydia, Mélissa, Smail, Kouceila, Ferhat, Toufik, Mohcine, Moumouh et Mahdi.

UAB Dehbia

Dédicace

Avec l'aide de Dieu, Tout Puissant, j'ai pu réaliser ce modeste travail que Je dédie A,

*Mon très cher père **AHCENE** qui a été mon ombre durant toutes les années de mes études, et qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager, à me donner l'aide et à me protéger, aucun mot ne peut exprimer mon respect et mon amour.*

*A celle qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, à la lumière de mes yeux ma très chère mère **NASSIRA**.*

Que dieu les garde et les protège.

*A mes frères : **TAAHAR** et **ALMANE***

A tout le membre de ma famille et surtout A mes chers cousins et cousines ainsi qu'à tous mes oncles et toutes mes tantes.

Merci pour tout, pour vos encouragements et soutient.

*A mon binôme : **DEHBA***

A mes adorables ami(e)s Qui ont partagées avec moi tous les moments de joie et de bonheur :

hanane, radia, louiza, sassia, dihia, taous, lydia,

Melissa, kouceila, smail, farhat et toufik

Tout ce qui m'aiment et A tout ce que j'aime.

***HADIBA** Siham*

Liste des abréviations

ATB	Antibiotique
ATCC	American Type Culture Collection
AX	Amoxicillin
BHIB	Brain Heart Infusion Borth
BLSE	Betalactamases à Spectre Elargi
°C	Degré Celsius
C3GR	Céphalosporine de 3 ^{eme} génération
Cm	Centimètre
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CO ₂	Désoxyde de Carbone
CXT	Céfotaxime
Da	Dalton
DL50	Dose Létale 50
DMSO	Dimethylsulfoxyde
DO	Densité Optique
EDTA	Acide Éthylènediaminetétraacétique
FOX	Cèfoxitine
g	Gramme
GN	Gélose nutritive
h	heur
HCl	Acide Chlorhydrique
HE (s)	Huile (s) Essentially (s)
VIH	Virus de l'immunodéficience
Kan	Kanamycine
Kb	kilo-base
KDa	Kilo Dalton

MH	Muller Hinton
ml	Millimètre
OMS	Organisation Mondiale de Santé
pH	Potentiel Hydrogène
SARM	Staphylocoque Dorés Résistant à la Méricilline
SXT	Sulfaméthoxazole
UFC	Unité Formant Colonie
V/V	Volume/Volume

Liste des tableaux

Tableau I : Les organes de certaines plantes riches en huiles essentielles	3
Tableau II : Exemples de la diversité d'applications des huiles essentielles.....	15
Tableau III : Classification botanique du gingembre	18
Tableau IV : Classification botanique du romarin	20
Tableau V : Les souches bactériennes testées	26
Tableau VI : Les huiles essentielles testées.....	28
Tableau VII : Valeurs des dilutions utilisées pour déterminer les CMI.....	32
Tableau VIII : Caractères morphologique des souches bactériennes étudiées.....	36
Tableau IX : Résultats des diamètres d'inhibition en mm (moyenne \pm l'écart type) des antibiotiques sur les quatre bactériennes	37
Tableau X : Résultats des diamètres d'inhibition en mm (moyenne \pm l'écart type) de l'activité antimicrobienne des deux huiles essentielles sur les quatre bactéries testées	38
Tableau XII : Résultats des diamètres d'inhibition en mm (moyenne \pm l'écart type) et la sensibilité de la nisine sur les quatre souches bactériennes testées.....	41
Tableau 12 : Tableau récapitulatif des résultats de la combinaison de deux huiles essentielles <i>Zingiber officinale</i> et <i>Rosmarinus officinalis</i> à trois concentrations différentes sur les quatre bactéries testées.....	44
Tableau XIII : Tableau récapitulatif des résultats de la combinaison entre la nisine et les deux huiles essentielles à trois concentrations différentes sur les quatre bactéries testées	45
Tableau XIV : Résultats des témoins positifs et négatif des souches fongiques réalisent avec l'antifongique, DMSO et HCl pour l'activité antifongique des deux HEs (<i>Zingiber officinale</i> , <i>Rosmarinus officinalis</i>) et la nisine	50
Tableau XV : Résultats des diamètres d'inhibition en mm (moyenne \pm l'écart type) des témoins positif et négatif de <i>Candidat albicans</i> et <i>Aspergillus niger</i>	51
Tableau XVI : Résultats des diamètres d'inhibition en mm (moyenne \pm l'écart type) de l'activité antifongique des deux huiles essentielles et la nisine vis-à-vis <i>candidat albicans</i> ...	52

Tableau XVII : Résultats des diamètres d'inhibition en mm (moyenne \pm l'écart type) de l'activité antifongique de la combinaison des deux huiles essentielles avec la nisine vis-à-vis <i>Candida albicans</i>	53
Tableau XVIII : Les résultats de la lecture du 2 ^{ème} jour et du 5 ^{ème} jour de test de sensibilité d' <i>Aspergillus niger</i> vis-à-vis les deux huiles et la nisine à différentes concentrations (15 ; 20 ; 25)	54
Tableau XIX : Résultats des diamètres de croissance en mm (moyenne \pm l'écart type) avec le calcul du taux d'inhibition de l'activité antifongique des deux l'HEs et nisine vis-à-vis <i>Aspergillus niger</i> à différentes concentration (15 ; 20 ; 25.)	55
Tableau XX : les résultats de la lecture du 2 ^{ème} jour et du 5 ^{ème} jour de test de sensibilité d' <i>Aspergillus niger</i> vis-à-vis les deux huiles en combinaison avec la nisine à différentes concentrations (1 ; 2 ; 3)	57
Tableau XXI : Résultats des diamètres de croissance en mm (moyenne \pm l'écart type) avec le calcul du taux d'inhibition de l'activité antifongique (<i>Aspergillus niger</i>) de deux huiles essentielles avec la nisine à différentes concentration (1, 2, 3)	58

Liste des figures

Figure 1 : Exemples de quelques structures de monoterpènes	5
Figure 2 : Exemples de quelques structures de sesquiterpènes	5
Figure 3 : Exemples de structures de composés dérivés du phénylpropane	6
Figure 4 : Schéma du principe de la technique d'hydrodistillation	11
Figure 5 : Système d'extraction des huiles essentielles par entraînement à la vapeur (LASEVE)	12
Figure 6 : Entraînement à la vapeur d'eau ascendante et descendante	13
Figure 7 : <i>Zingiber officinale</i> (Roscoe)	18
Figure 8 : Photographie du rhizome et feuilles du gingembre	19
Figure 9 : <i>Rosmarinus officinalis</i>	20
Figure 10 : Photo des feuilles, et des fleurs du romarin	21
Figure 11 : Modèle de formation d'un pore transmembranaire par la nisine	24
Figure 12 : Photo représentative de l'étape de prélèvement des disques de gélose tapissé d' <i>Aspergillus Niger</i>	34
Figure 13 : Photo représentative de l'étape de dépôt des disques de gélose tapissé d' <i>Aspergillus Niger</i>	35
Figure14 : Photographies des témoins négatifs réalisés avec HCL sur les bactéries testées...	36
Figure15 : Photographies des témoins négatifs réalisés avec DMSO sur les bactéries testées	36
Figure 16 : Photographies des témoins positifs réalisés avec 04 antibiotiques sur les quatre souches	37
Figure 17 : Effet de l'H.E de Gingembre sur les quatre souches bactériennes testées.....	38
Figure 18 : Effet de l'H.E de Romarin sur les quatre souches bactériennes testées	38
Figure 19 : Effet de la nisine sur les quatre souches bactéries testées.....	41

Figure 20 : Résultat de la combinaison des deux huiles essentielles <i>Zingiber officinale</i> et <i>Rosmarinus officinalis</i> à trois concentrations différentes sur les quatre bactéries testées	43
Figure 21 : Résultat de la combinaison d'HE <i>Zingiber officinale</i> et la nisine a trois concentrations différentes sur les quatre bactéries testées	44
Figure 22 : Résultat de la combinaison d' H.E de <i>Rosmarinus officinalis</i> et la nisine a trois concentrations différentes sur les quatre bactéries testées	45
Figure 23 : Série de dilution réalisée afin de déterminer la CMI en milieu liquide de l'HE de <i>Rosmarinus officinalis</i> sur la souche <i>P.aeruginos</i>	48
Figure 24 : Série de dilution réalisée afin de déterminer la CMI en milieu liquide de la combinaison de deux huiles a la concentration 75% d'H.E de <i>Zingiber officinale</i> +25% d''H.E de <i>Rosmarinus officinalis</i> sur la souche <i>B.cereus</i>	49
Figure 25 : Résultat de test de sensibilités de la souche fongique <i>Conditat albicans</i> vis-à-vis de l'huile essentielle de <i>Zingiber officinale</i>	51
Figure 26 : Résultat de test de sensibilités de la souche fongique <i>Conditat albicans</i> vis-à-vis de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i>	51
Figure27 : Résultat de teste de sensibilité de <i>candidat albicans</i> vis à vis la nisine	52
Figure 28 : Résultat de teste de sensibilité de <i>candidat albicans</i> vis à vis les deux huiles <i>zingiber officinale</i> et <i>rosmarinus officinalis</i> en combinaison avec la <i>nisine</i> à différentes concentration. (À droite <i>Zingiber officinale</i> + nisine, à gauche <i>Rosmarinus officinalis</i> + nisine)	53



Tables des matières

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Résumé

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

Partie bibliographique

Chapitre I : Généralités sur les huiles essentielles

1. Définition.....	2
2. La répartition et la localisation dans la plante	3
3. Propriétés physique	4
4. La composition chimique	4
4.1. Des composés terpéniques	4
4.2. Des composés aromatiques	5
5. Rôle des huiles essentielles dans la plante	6
6. Activités biologiques	7
6.1. Activité antibactérienne.....	7
6.2. Activité antifongique	8
6.3. Activité antiviral.....	9
6.4. Activité anti-oxydante	9
6.5. Activité anti-inflammatoire	9
7. Méthodes d'extraction	10
7.1. La distillation	10
7.1.1. L'hydrodistillation (water distillation)	11
7.1.2. La distillation par la vapeur d'eau (steam distillation)	11
7.1.3. L'hydrodiffusion.....	12
7.2. Extraction par solvants et corps gras	13
8. Méthodes de conservation.....	14
9. Objectif d'utilisation	15
10. La toxicité.....	16

Chapitre II : Description des plantes étudiées

1. <i>Zingiber officinale</i> (gingembre)	18
1.1. Classification botanique	18
1.2. La description botanique	19
1.3. Domaine d'utilisation	19
2. <i>Rosmarinus officinalis</i> (romarin)	20
2.1. Classification botanique	20
2.2. La description botanique	21
2.3. Domaine d'utilisation	21

Chapitre III : Notions sur la nisine

1. Définition	23
2. La structure et propriété physico-chimique	23
3. La biosynthèse	23
4. Spectre d'Activité.....	24
5. Mode d'Action	24
6. Toxicité	25
7. Rôle et conservation des aliments	25

Partie expérimentale

I. Matériel et méthodes

I. Matériel et méthodes.....	26
1. Matériel	26
1.1. Appareillage	26
1.2. Micro-organismes	26
1.3. Les milieux de culture	27
1.4. Les Antibiotiques et Antifongique utilisés	27
1.4.1. Les Antibiotiques	27
1.4.2. L'Antifongique.....	27
1.5. Les huiles essentielles Testées.....	28
1.6. La bactériocine utilisée.....	28
1.7. L'Emulsifiant utilisé	28

2. Méthodes	28
2.1. Préparation du milieu de culture	28
2.2. Vérification de la pureté des souches bactériennes et préparation de l'inoculum	29
2.3. Etude de l'activité antibactérienne des extraits utilisés (deux huiles essentielles et la nisine)	30
2.3.1. Teste de sensibilité aux huiles essentielles	30
2.3.2. Teste de sensibilité au bactériocine (nisine)	31
2.3.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	31
2.4. Etude de l'effet combiné des huiles essentielles et avec la nisine	33
2.4.1. Test de sensibilité vis-à-vis la combinaison des deux huiles essentielles	33
2.4.2. Test de sensibilité vis-à-vis la combinaison des deux huiles essentielles et la nisine	33
2.5. Etude de l'activité antifongique des deux huiles essentielles et la nisine	34
2.5.1 Préparation de la suspension fongique	34
2.5.1.1. <i>Candida albicans</i>	34
2.5.1.2. <i>Aspergillus niger</i>	34
II. Résultats et Discussion	
II. Résultats et Discussion	36
1. Résultats des tests de vérification des souches bactériennes	36
2. Résultats de l'activité antibactérienne de deux huiles essentielles et la nisine	36
2.1. Résultats des témoins négatifs	36
2.2. Résultats des témoins positifs	37
2.3. Résultats du test de sensibilité aux huiles essentielles	38
2.4. Résultats du test de sensibilité au bactériocine (Nisine)	41
3. Les résultats des effets antibactériens des combinaisons	43
3.1. Les résultats de la combinaison des huiles essentielles	43
3.2. Les résultats de la combinaison des huiles essentielles avec la nisine	44
3.2.1. Les résultats de la combinaison d'H.E de <i>Zingiber officinale</i> avec la nisine	44
3.2.2. Les résultats de la combinaison d'H.E de <i>Rosmarinus officinalis</i> avec la nisine	45
4. Résultat de la Concentration Minimale Inhibitrice	48

5. Résultats de l'activité antifongique de deux huiles essentielle et la nisine	50
5.1 Résultats des témoins	50
5.2. Résultats de l'activité antifongique des deux huiles essentielles et nisine	51
5.2.1. <i>Conditat albicans</i>	51
5.2.2 <i>Aspergillus niger</i>	54
Conclusion et perspectives	60

Références bibliographiques

Annexe

Résumé

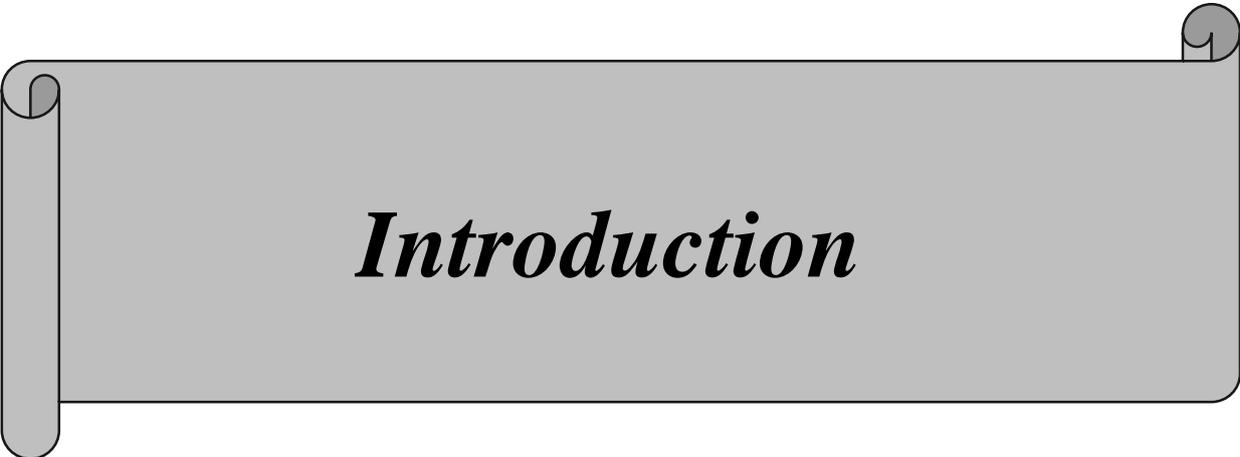
L'étude a porté d'une part, sur l'activité antimicrobienne de deux huiles essentielles de deux plantes médicinales *Zingiber officinale* et *Rosmarinus officinalis* et d'autre part sur la nisine. Elles sont testées seules et en combinaison par la méthode de diffusion des disques sur milieu gélosé. Quatre espèces bactériennes de référence ont montré que l'huile de *Rosmarinus officinalis*, à la concentration de 10µl, présente une activité antibactérienne supérieure à l'huile de *Zingiber officinale* et à la nisine. Par contre les combinaisons de deux huiles essentielles ont révélé un effet synergique vis-à-vis *Bacillus cereus* à différentes concentrations. La combinaison de l'HE *Zingiber officinale*+nisine a présenté un effet synergique vis-à-vis *Pseudomonas aeruginosa*. De même pour *Bacillus cereus* à la combinaison de 75% d'HE *Rosmarinus officinalis*+25% de nisine. Les résultats de l'activité antifongique ont révélé que les deux huiles ne possèdent aucune activité antifongique contre *Aspergillus niger* par contre une activité envers *Candidats albicans*. Quant à la nisine, elle ne possède aucune activité contre les deux souches fongiques. L'utilisation des huiles essentielles en combinaison avec d'autres produits naturels efficaces comme la nisine représente une alternative aux antibiotiques.

Mots clés : Huiles essentielles, Activité antibactérienne, *Zingiber officinale*, *Rosmarinus officinalis*, Activité antifongique, Nisine, Synergie.

Abstract

The study focused on the antimicrobial activity of two essential oils of two medicinal plants *Zingiber officinale* and *Rosmarinus officinalis* and secondly on nisin. They are tested alone and in combination by the diffusion method of discs on agar medium. Four reference bacterial species have shown that *Rosmarinus officinalis* oil, at a concentration of 10µl, has superior antibacterial activity compared to *Zingiber officinale* oil and nisin. On the other hand, the combinations of two essential oils revealed a synergistic effect that's to say *Bacillus cereus* at different concentrations. The combination of EO *Zingiber officinale* + nisine showed a synergistic effect against *Pseudomonas aeruginosa*. Similarly for *Bacillus cereus* with the combination of 75% EO *Rosmarinus officinalis* + 25% nisin. The results of the antifungal activity revealed that both oils have no antifungal activity against *Candidates albicans* and *Aspergillus niger*. As for nisin, it has no activity against both fungal strains. The use of essential oils in combination with other effective natural products like nisin which represents an alternative to antibiotics.

Keywords: Essential oils, Antibacterial activity, *Zingiber officinale*, *Rosmarinus officinalis*, Antifungal activity, Nisin, Synergy.



Introduction

Introduction

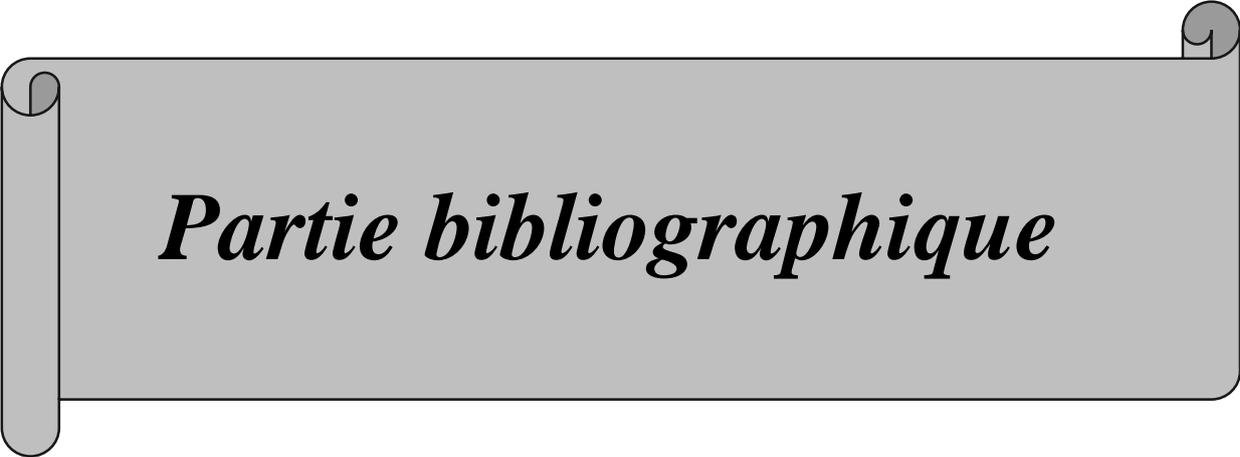
Aujourd'hui encore, diverses maladies sont traitées uniquement par les seules thérapies naturelles qui font appel non seulement aux plantes aromatiques, mais aussi à leurs huiles essentielles.

L'utilisation de ces huiles et de composés d'origine végétale sont des sources précieuses pour la médecine traditionnelle dans le traitement et la prévention d'un large éventail de maladies ; notamment des maladies infectieuses (Al-Bayati et Khudir, 2007). Le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques a conduit les chercheurs à puiser dans le monde végétal et particulièrement les plantes médicinales et culinaires en quête de molécules naturelles efficaces et dénuées de tout effet adverse (Rauter *et al.* 1989). Dans ce but, l'investigation des plantes représente un potentiel inestimable pour la découverte de nouvelles substances à pouvoir antimicrobien. Ainsi, les huiles végétales commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives (Bruneton, 1999 ; Teuscher *et al.* 2005). Elles font l'objet d'étude pour leur éventuelle utilisation comme alternative pour le traitement des maladies infectieuses (Chalchat *et al.* 1997 ; Baser *et al.* 2001).

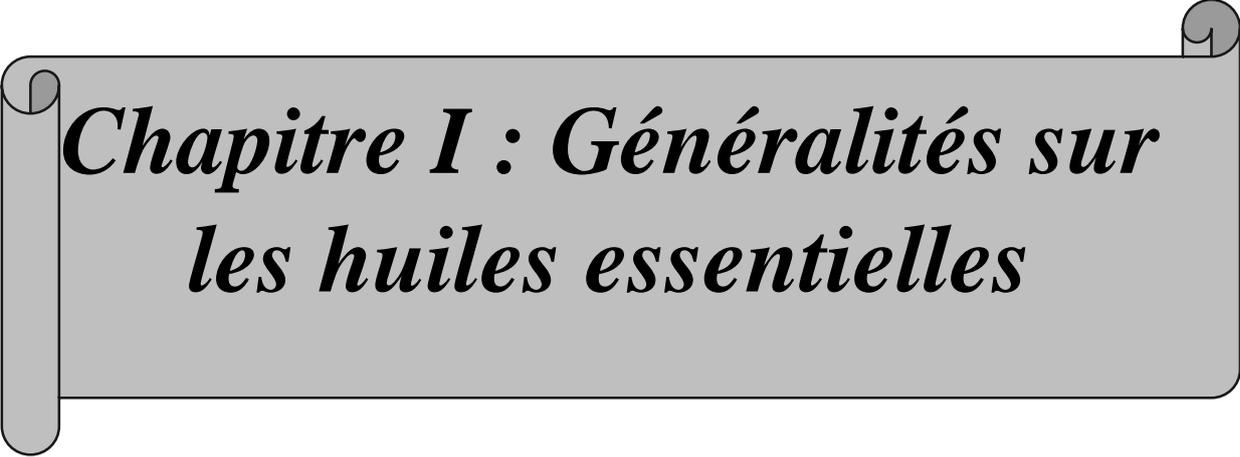
Les bactéries lactiques tel que *Streptococcus lactis* ont la capacité de produire des composés antibactériens appelés « bactériocines ». Ces dernières ont un large spectre d'inhibition incluant des micro-organismes d'altération et pathogènes. Ceci a conduit les chercheurs à s'intéresser à ces molécules et à leur éventuelle application dans le domaine de l'agro-alimentaire comme bio-conservateur et en médecine humaine et vétérinaire comme de nouveaux agents antimicrobiens. La plupart des bactériocines ont pour cible la membrane cytoplasmique des bactéries à Gram positif dans laquelle elles induisent la formation des pores aboutissant à la sortie des molécules intracellulaires.

Ce travail a pour objectif d'étudier l'activité antimicrobienne de deux huiles essentielles de deux plantes *Zingiber officinale* et *Rosmarinus officinalis*, en combinaison avec la nisine. Ceci à travers :

- Le test antimicrobien de ces huiles et la nisine seules et en combinaison vis-à-vis de quatre espèces bactériennes de référence, à Gram positif et à Gram négatif, et de deux souches fongiques en milieu gélosé.
- La détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) en milieu liquide.



Partie bibliographique



*Chapitre I : Généralités sur
les huiles essentielles*

1. Définition

Les huiles essentielles doivent leur nom à ce qu'elles sont très réfringentes, hydrophobes, lipophiles, volatiles, odorantes, inflammables et liquides très complexes qui sont sécrétées par les plantes aromatiques.

Elles se forment dans un grand nombre de plantes comme sous-produits du métabolisme secondaire. Que l'on extrait par divers procédés dont l'entraînement à la vapeur d'eau, distillation sèche et par un procédé mécanique approprié sans chauffage, qui sont séparées de la phase aqueuse par des procédés physiques n'entraînant pas de changement significatif de sa composition (Chiasson et Beloin, 2007).

Leur chimie est complexe mais en général sont un mélange de terpène, d'alcool, d'aldéhyde, cétone et d'ester, elles sont solubles dans les huiles et dans l'alcool, mais ne le sont pas dans l'eau (Padrimi et Lucheromi, 1998).

Association Française de normalisation AFNOR NF T 75-006 définit les huiles essentielles, souvent appelées essences, comme étant l'extrait obtenu à partir d'une matière végétale, par entraînement à la vapeur d'eau, par des procédés mécaniques et par distillation sèche.

« L'huile essentielle est le produit de la distillation à la vapeur d'eau d'une plante aromatique. L'Hydrosol, eau florale ou hydrolat, est le produit second de la distillation. Grâce à la différence de densité, l'huile essentielle flotte au-dessus de l'eau florale. La séparation se fait au moyen de l'essencier ou vase florentin.

Il existe deux méthodes principales d'obtention des huiles essentielles : la distillation lente à la vapeur d'eau et l'expression mécanique (pour les agrumes).

La qualité de l'huile essentielle engendre son efficacité : préférez des huiles essentielles rigoureusement sélectionnées, provenant de plantes sauvages ou de culture biologique et des huiles essentielles « sortant de l'alambic » (ne pas confondre les huiles essentielles avec les arômes de synthèse vendus pour les pots-pourris, sans nom, sans garantie de qualité) » (Grosjean, 2008).

2. La répartition et la localisation dans la plante

Les HEs sont largement répandues dans le règne végétal et on les trouve quasiment que chez les végétaux supérieurs. Les familles botaniques capables d'élaborer les constituants qui composent les huiles essentielles sont réparties dans une cinquantaine de familles botaniques parmi lesquelles : *Myrtaceae* (Girofle), *Lauraceae* (laurier), *Rutaceae* (citron), *Lamiaceae* (Menthe), *Apiaceae* (Coriandre), *Zingiberaceae*(Gingembre)...etc. (Bellakhdar, 1997).

Tableau I

Elles peuvent être stockées à l'intérieur d'un ou de plusieurs organes, à titre d'exemples on cite :

Tableau I : les organes de certaines plantes riches en huiles essentielles (Sangwan *et al.* 2001).

Organe de la plante	Exemple
Les rhizomes	Gingembre (<i>Zingiber officinalis Roscoe</i>)
Les tiges	Romarin (<i>Romarsins officinalis L.</i>)
Les fleurs	Giroflier (<i>Syzygium aromaticum L.</i>)
Les feuilles	Menthe (<i>Mentha piperita L.</i>)
Les fruits	Bigaradier (<i>Citrus aurantium L.</i>)
Les racines	Vétiver (<i>Vetiveria zizanioides Stapf</i>)

D'après (Ganzalez *et al.* 2007) Les huiles essentielles sont élaborées par des glandes sécrétrices qui se situent presque sur toutes les parties de la plante, puis elles sont sécrétées au sein du cytoplasme de certaines cellules où se rassemblent sous formes de petites gouttelettes comme la plupart des substances lipophiles.

La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles sont généralement associées à la présence des structures histologiques spécialisées qui peuvent être assurées par : des cellules sécrétrices (cellules à huiles essentielles de *Lauraceae*), des poils sécréteurs (les poils sécréteurs des *laminaceaes*), poches sécrétrices (*Myrtaceaes*), les canaux sécréteurs qui existent dans de nombreuses familles et des trichomes glandulaires (Bruneton, 1999 ; Bakkali *et al.* 2008).

3. Les propriétés physiques

Malgré leurs différences de composition, les huiles essentielles présentent un certain nombre de caractères en communs.

En général les huiles essentielles sont liquides à température ambiante (30 à 40°C), Certaines d'entre elles cristallisent à basse température, Volatiles, elles sont liposolubles (solubles dans les huiles des solvants organiques apolaires et dans l'alcool), entraînaibles à la vapeur d'eau mais très peu solubles dans l'eau (faut donc impérativement un tensioactif pour permettre leurs mise en suspension dans l'eau). Leur densité est inférieure à 1 (inférieure à celle de l'eau) sauf quelques exceptions (HE de cannelle), indice de réfraction élevé, peuvent être incolores ou colorées, leurs nombre d'atomes de carbone étant compris entre 5 et 22 et sont altérables et sensibles à l'oxydation (Afssaps, 2008).

4. La composition chimique

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes appartiennent principalement à deux groupes de voies métaboliques distinctes. Il s'agit :

4.1. Des composés terpéniques

Ce sont des hydrocarbures ayant respectivement dix et quinze atomes de carbone, qui peuvent être saturés ou insaturés, acycliques, monocycliques, bicycliques ou polycycliques. Ils peuvent également être accompagnés de leurs dérivés oxygénés : alcools, esters, éthers, aldéhydes, cétones, etc.

Ces composés se sont des molécules volatiles appartenant pour la grande majorité à la famille des terpènes. Seuls les terpènes les plus volatils, c'est-à-dire ceux dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée : les monoterpènes (myrcène, P-pinène, γ -terpinène, etc.), et les sesquiterpènes (Ecaryophyllène, α -humulène) (Bakkali *et al.* 2008).

Rappelons ici que les terpènes sont des composés issus du couplage de plusieurs unités « isopréniques » (C_5H_8), soit deux unités pour les monoterpènes ($C_{10}H_{16}$) (figure1) et trois pour les sesquiterpènes ($C_{15}H_{24}$) (figure2). Et rarement, quelques diterpènes ($C_{20}H_{32}$) peuvent se retrouver dans les huiles essentielles (Besombes, 2008).

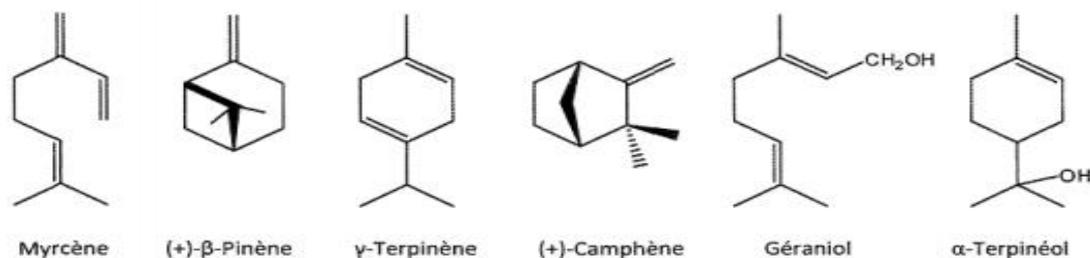


Figure 1 : Exemples de quelques structures de monoterpènes (Piochon, 2008).

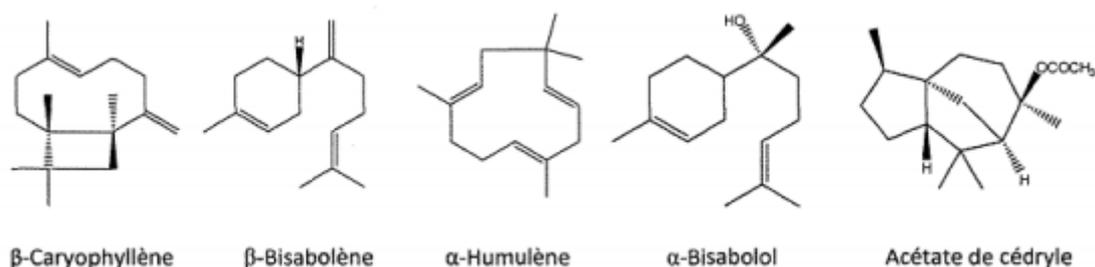


Figure 2 : Exemples de quelques structures de sesquiterpènes (Piochon, 2008).

4.2. Des composés aromatiques

Ce sont des Composés aromatiques dérivés du phénylpropane (Kurkin, 2003). Cette classe comporte des composés odorants bien connus comme la vanilline, l'eugénol, l'anéthole, l'estragole et bien d'autres fournissent une saveur significative et indispensable à l'huile essentielle. Enfin, il existe un nombre non négligeable de composés volatils issus de la dégradation, de terpènes non volatils par exemple le cas des ionones qui proviennent de l'auto-oxydation des carotènes) et d'acides gras (les petites molécules odorantes, comme par les méthyl-cétones qui proviennent de la β oxydation). Des composés azotés ou soufrés qui sont rares dans les huiles essentielles. On peut également retrouver des produits de masse moléculaire plus importante non entraîné à la vapeur d'eau (Bruneton, 1999).

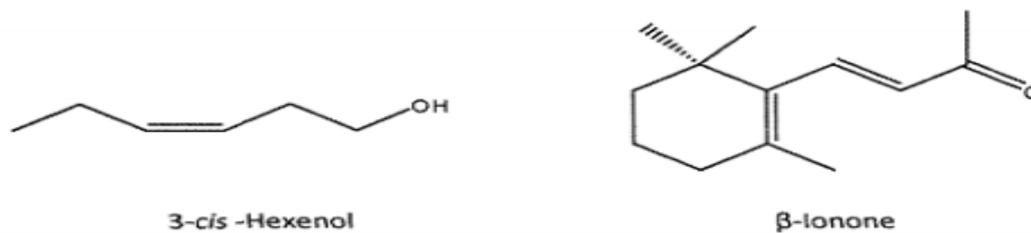


Figure 3 : Exemples de structures de composés dérivés du phénylpropane (Piochon, 2008).

5. Le rôle des huiles essentielles dans la plante

Les HEs sont des produits du métabolisme secondaire de la plante de ce fait ils n'ont aucun rôle dans les aspects fondamentaux du développement de la plante. Par contre, le rôle de certains mono et sesquiterpènes a été expérimentalement établi aussi bien dans le domaine des interactions végétal-végétal, que dans celui des interactions végétal-animal (Bruneton, 1993 ; Croteau *et al.* 2000).

Dans le domaine des interactions végétal-végétal par exemple, les propriétés fongicides et herbicides des monoterpènes ont été rapportées par (Evenari, 1949 ; Fischer, 1986) et celles des hydrocarbures sesquiterpéniques (Spencer *et al.* 1984).

Dans le domaine des interactions végétal-animal, les travaux de (Stlpanovic *et al.* 1986) ont montré que les terpénoïdes jouent un rôle dans la résistance des plantes aux insectes.

Une mise au point récente de (Croteau, 1986), attribue aux huiles essentielles un rôle de Mobilisateur d'énergie lumineuse et de régulateur thermique, au profit de la plante.

Pour certains auteurs, les huiles essentielles constitueraient « les déchets » du métabolisme cellulaire de la plante (Salle, 1991), pour d'autres, elles serviraient à attirer les pollinisateurs et de repousser les ennemis, favorisant ainsi la dispersion du pollen et des graines (Bakkali *et al.* 2008). Elles servent aussi à régler la température à l'intérieur de la plante lui permettent ainsi de mieux supporter la chaleur.

6. Activités biologiques

Au cours de ces dernières années les huiles essentielles ont été utilisées pour traiter certaines anomalies, en raison de ses activités biologiques qui dépendent directement de la composition chimique de ces huiles.

D'après Teke *et al.* (2013), les huiles essentielles ont plusieurs activités biologiques à savoir l'activité antibactérienne, antifongique, antivirale, pesticide et même une activité anticancéreuse.

En phytothérapie, elles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses, cependant, elles possèdent également des propriétés cytotoxiques qui les rapprochent, donc des antiseptiques et désinfectants en tant qu'agents antimicrobiens à large spectre (Ferhat *et al.* 2009).

6.1. Activité antibactérienne

Depuis l'antiquité les huiles essentielles ont été considérées comme agents antimicrobiens les plus efficaces dans ces plantes aromatiques.

Tandis que leurs extraits aromatiques ont été utilisés dans les formulations telles que les médicaments et les parfumeries (Heath, 1981).

Cette action est par ailleurs variable d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche bactérienne à une autre (Kalemba, 2003 ; Oussou, 2009 ; Avlessi, 2012). Elles peuvent être bactéricides ou bactériostatiques (Oussou, 2009), à l'égard des bactéries pathogènes et même celles qui sont résistantes aux antibiotiques, cet effet peut être exploité dans divers domaines tels que l'agro-alimentaire dans la conservation et le pharmaceutique dans la production des médicaments (Bruneton, 1999 ; Hammer *et al.* 1999 ; Bakkali *et al.* 2008 ; Sakkas, 2017).

Leur activité antimicrobienne est principalement en fonction de leurs différentes compositions chimiques en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs (Sipailiene *et al.* 2006 ; Oussou, 2009).

Les huiles essentielles agissent aussi bien sur les bactéries à Gram positif que les bactéries à Gram négatif. Toutefois, les bactéries à Gram négatif paraissent moins sensibles à leurs actions et ceci est directement lié à la nature de leur paroi cellulaire qui possède une membrane externe supplémentaire qui leur confère une protection (Gabriel *et al.* 2013).

Selon Burt (2004), l'effet combiné des huiles essentielles dépend de leurs composés actifs et inactifs, car ces derniers peuvent influencer la biodisponibilité des composés actifs ce qui rend l'HE en son intégrité possède un pouvoir antimicrobien plus élevé que le mélange de leur principaux composants qui sont carvacrol, thymol, eugénol, perillaldéhyde, cinnamaldéhyde et l'acide cinnamique (Bassole et Juliani, 2012).

D'après Dorman (2000), les bactéries à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa* possèdent une résistance intrinsèque aux agents biocides, en relation avec la nature de sa membrane externe. Cette dernière possède une barrière imperméable aux composés hydrophobes qui est composée de lipopolysaccharides. En présence d'agents perméabilisants de la membrane externe, des substances inactives contre *Pseudomonas aeruginosa* deviennent actives (Mann *et al.* 2000). Il semble que cette souche se révèle résistante à un très grand nombre d'huiles essentielles (Hammer *et al.* 1999 ; Deans et Ritchie, 1987).

Certaines huiles essentielles sont révélées efficaces contre les bactéries multi-résistantes notamment les *E. coli* résistantes aux céphalosporines de 3ème génération (C3GR), *E.coli* productrice de betalactamases à spectre élargi (BLSE) et staphylocoques dorés résistants à la méticilline (SARM).

6.2. Activité antifongique

Les HEs peuvent être utilisées comme des agents antifongiques sans effets secondaires pour l'homme ou de pollution de l'environnement car elles possèdent une activité antifongique qui peut être liée à certains composants (Chang *et al.* 2006 ; Vidyasagar et Nuzhat, 2013 ; Hamdani et Allem, 2015).

Selon Buchbaur et Lang(2012), l'HE de *Citrus sinensis* (L.) qui est riche en limonène exerce son pouvoir antifongique contre *Aspergillus niger* en détruisant sa paroi mycélienne, son effet fongicide augmente avec l'augmentation de sa concentration, cependant l'un des modes d'action des HEs possédant un pouvoir antifongique contre les champignons phytopathogènes appartiennent à la famille des *Lamiaceae* semble être la destruction du mycélium existant et l'inhibition du développement de nouveaux mycéliums.

Les mycoses sont d'une actualité criante, l'abus d'antibiotiques favorise leur extension, avec les huiles essentielles combinées avec sesquiterpéniques et les lactones sesquiterpéniques. Par ailleurs, les mycoses ne se développent pas sur un terrain acide. Ainsi il faut chercher à alcaliniser le terrain (Belkou, 2005).

Plusieurs huiles essentielles appartenant aux familles des *Lamiaceae* exercent un effet inhibiteur contre les levures essentiellement *Candida albicans* (Buchbauer et Lang, 2012).

Selon les résultats de Ouelhadj *et al.* (2011), les huiles essentielles peuvent être une source non négligeable d'antifongique utilisable même dans la conservation des fruits (la fraise et les raisins).

6.3. Activité antiviral

Les virus ont une forte sensibilité aux molécules aromatiques ce qui confère une amélioration apportant avec leur utilisation contre les pathologies sévères virales (Zhiri, 2006).

L'huile essentielle de *Thymus capitatus* (L) agit au niveau des capsides (ECv et ADV) dans le cas des virus nus et au niveau de l'enveloppe dans le cas des virus enveloppés (HSv1). Elle les neutralise en les empêchant d'être adsorbés et de pénétrer dans la cellule (Belhadj Salah-fatnassi *et al.* 2010).

L'évaluation de l'activité antivirale de l'extrait commercial du Romarin a indiqué qu'il y a une inhibition de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (HIV) à une concentration très basse. Cependant, le carnosol a montré une activité (anti-HIV) à une concentration modérée qui n'était pas cytotoxique (Aruoma *et al.* 1996).

6.4. Activité anti-oxydante

Certains constituants des huiles essentielles présentent un pouvoir antioxydant et anti-radicalaire très marquant. Ainsi que leur incorporation directe dans les aliments contribue à améliorer la durée de vie de ces derniers en les préservant des phénomènes d'oxydation (Djenane *et al.* 2001 ; Callet et Lacroix, 2007).

6.5. Activité anti inflammatoire

Plus récemment, des études ont montré que les huiles essentielles de *Chromoleana odorata* et de *Mikania cordata*, donnaient des tests d'inhibition positifs sur la lipoxigénase L-1 de soja, modèle de la lipoxigénase humaine (5-LO) impliquée dans les processus de l'inflammation (Bedi *et al.* 2004). Ensuite, dans une autre étude, il a été montré que celles de *Chromoleana odorata* présentaient des actions positives sur la fonction Cyclooxygénase de la Prostaglandine H-synthétase (Bedi *et al.* 2010).

Les HEs possèdent d'autres activités en plus de celles citées plus haut parmi elles on a :

- L'activité antalgique qui a été reporté suite à certaines études, il s'agit soit de l'activité de l'huile en entier ou bien de certains de ces composants (Buchbauer et Adorjan, 2010) ;
- Une action puissante contre les parasites grâce au groupe phénol (Benayad, 2008) ;
- Il est bien connu que certains aliments, comme l'ail ou le curcuma, sont de bonnes sources d'agents anticancéreux utiles pour prévenir l'apparition de cancer (Béliveau et Gingras, 2005).

7. Méthodes d'extraction

Le choix de la technique dépend principalement de la nature de la matière végétale, des caractéristiques Physico-chimiques des extraits et de l'usage de ces derniers. Le rendement « HE/matière première végétale » peut être extrêmement variable selon les plantes. Ce choix conditionne les caractéristiques de l'HE, en particulier : viscosité, couleur, solubilité, volatilité, enrichissement ou appauvrissement en certains constituants, utilisations et applications. (Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles).

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

7.1. La distillation

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

7.1.1. L'hydrodistillation (water distillation)

Il s'agit du procédé le plus couramment employé pour l'extraction des HEs. Elle est considérée comme étant la plus simple et la plus anciennement utilisée (figure 4) (Bruneton, 1999 ; Lucchesi, 2005). Le matériel végétal est immergé directement dans un alambic rempli d'eau placé sur une source de chaleur. Le tout est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées dans un réfrigérant et l'huile essentielle se sépare de l'hydrolat par simple différence de densité. L'huile essentielle étant plus légère que l'eau (sauf quelques rares exceptions), elle surnage au-dessus de l'hydrolat.

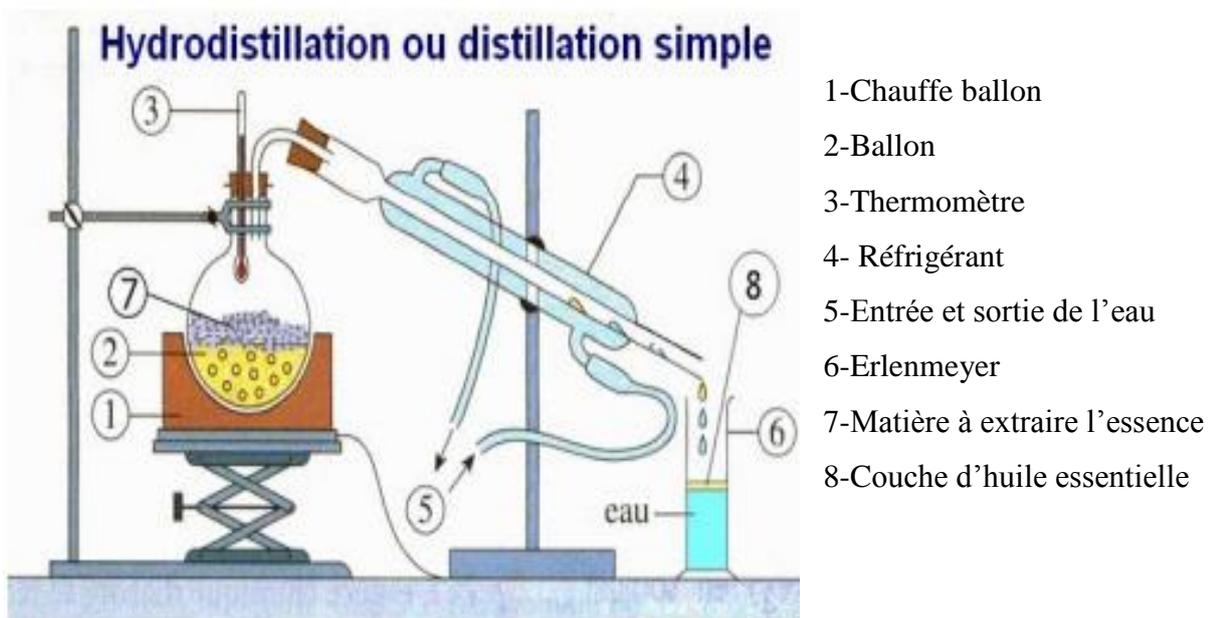


Figure 4 : Schéma du principe de la technique d'hydrodistillation (Lucchesi, 2005).

7.1.2. La distillation par entraînement à la vapeur d'eau (steam distillation)

Dans ce type de distillation, le matériel végétal ne macère pas directement dans l'eau contrairement à l'hydrodistillation. Il est placé sur une grille perforée au travers de laquelle passe la vapeur d'eau. Figure 5.

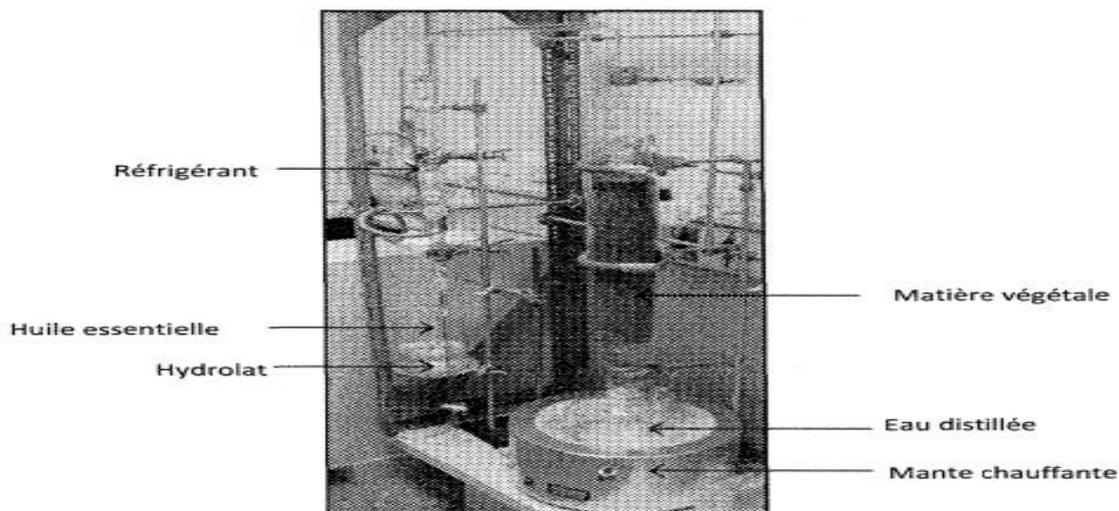


Figure 5 : Système d'extraction des huiles essentielles par entraînement à la vapeur (LASEVE).

La vapeur endommage la structure des cellules végétales et libère ainsi l'HE qui est vaporisée sous forme d'un mélange d'eau et d'HE. Cette méthode apporte une amélioration de la qualité de l'huile essentielle en minimisant les altérations hydrolytiques (Franchomme *et al*, 1990).

Le mélange passe alors par un condenseur et un essencier, pour ensuite être séparé en une phase organique (qui est l'HE) et une phase aqueuse (l'eau) (Figure 6) (Lucchesi, 2005).

7.1.3 L'hydrodiffusion

Cette technique relativement récente est particulière. Elle consiste à faire passer, du haut vers le bas (per descendum) et à pression réduite, la vapeur d'eau au travers de la matrice végétale. L'avantage de cette méthode est d'être plus rapide donc moins dommageable pour les composés volatils et peu coûteux. Cependant, l'huile essentielle obtenue avec ce procédé contient des composés non volatils ce qui lui vaut une appellation spéciale : « essence de percolation » (Franchomme *et al*. 1990 ; Richard, 1992).

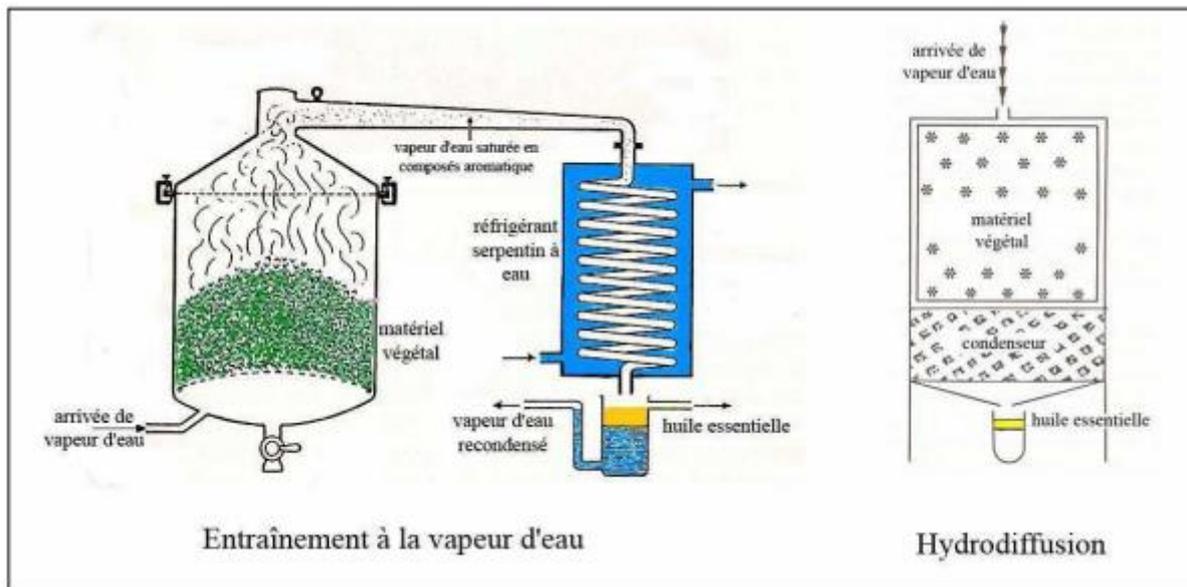


Figure 6 : Entraînement à la vapeur d'eau ascendante et descendante (Lucchesi, 2005).

7.2 Extraction par solvants et corps gras

Elles sont basées sur le fait que les essences aromatiques sont solubles dans la plupart des solvants organiques. L'extraction se fait dans des extracteurs de construction variée, en continu, semi-continu ou en discontinu. Le procédé consiste à épuiser le matériel végétal par un solvant à bas point d'ébullition qui sera ensuite éliminé par distillation sous pression réduite. L'évaporation du solvant donne la concrète : mélange odorant de consistance pâteuse. L'extraction de la Concrète avec l'alcool conduit à l'absolue. Le choix du solvant est effectué en tenant compte des paramètres techniques, économiques et des propriétés physico-chimiques des solvants, telles que : la température d'ébullition, la constante diélectrique, la miscibilité avec d'autres solvants, etc.

- La constante diélectrique est une bonne indication de la polarité du solvant ;
- Le point d'ébullition ne devra pas être trop élevé pour faciliter l'élimination ultérieure à Pression réduite tout en réduisant les pertes en arômes à leur minimum ;
- Le pouvoir solvant : chaque solvant n'a pas la même affinité vis-à-vis de chacun des composés organiques participant à l'arôme. La conséquence est que le pourcentage de récupération de chacun des éléments du mélange et la qualité de l'extrait aromatique obtenu seront variables en fonction du type de solvant utilisé (Richardh et Etievantp, 1997).

Dans le cas des extraits à l'aide de corps gras, un lavage à l'éthanol permet l'élimination de ces composés non désirables. La solution alcoolique ainsi récoltée est refroidie jusqu'à -10°C pour en séparer les cires végétales qui se solidifient. Après distillation de l'alcool, le produit obtenu est appelé "absolu" et sa composition se rapproche de celle d'une huile essentielle (Proust, 2006). L'extraction à l'aide de solvants organiques pose un problème de toxicité des solvants résiduels ce qui n'est pas négligeable lorsque l'extrait est destiné aux industries pharmaceutique et agro-alimentaire (Bruneton, 1999).

Il existe d'autres méthodes d'extraction des huiles essentielles parmi elles :

- Extraction au CO_2 supercritique ;
- Extraction par micro-ondes.

8. Les méthodes de conservation et stockage

Selon Lobstein *et al* (1983), une huile essentielle ne dépasse pas une année car au fil du temps elles subissent des modifications physico-chimiques importantes pour cela La conservation des huiles essentielles s'avère très difficile.

Pour avoir une meilleure préservation de sa qualité il est nécessaire de respecter certaines règles élémentaires de stockage :

- Utilisation de flacons de faibles volumes (flacon en verre brun, en aluminium ou en acier inoxydable) ;
- Conservation sous atmosphère d'azote ;
- Stockage à basse température ;
- Eviter le contact entre l'huile essentielle et le bouchon (les flacons doivent être stockés en position vertical), etc...

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

D'autres moyens de protection, comme la protection anodique activée et la stabilisation par rayons gamma.

9. Objectifs d'utilisation des huiles essentielles

Selon Nzeyumwami (2004), Outre l'emploi strictement médical des huiles essentielles, celles-ci sont utilisées dans de nombreux domaines tels que la parfumerie, la cosmétologie, l'agro-alimentaire, et l'industrie chimique. Deux industries se partagent ce marché mondial florissant ; il s'agit de l'industrie agroalimentaire et la parfumerie. Les huiles essentielles interviennent dans la fabrication :

- Des produits alimentaires : jus de fruits, crèmes glacées, bonbons, etc. ;
- De tabac pour cigarettes ;
- Des produits d'hygiène et de beauté ;
- Des parfums, la désinfection des locaux (elles sont antiseptiques) ;
- Des colles et vernis dans l'industrie chimique, Médecine, parfumerie, alimentaire, et aromathérapie sont autant de destinations pour un marché des huiles essentielles dont la production mondiale, en croissance régulière, est estimée à plus de 110 000 tonnes.

Tableau II : Exemples de la diversité d'applications des huiles essentielles (Grysole, 2005).

Huiles essentielles	Parfumerie		Alimentation	Médecine
	Cosmétique	Techniques		
Basilic	Parfum		Arôme pour sauces et condiments	Antispasmodique régulateur du système
Citronnelle		Arôme pour savons, désinfectant, éloigne les insectes	Arôme pour boissons et sucreries	
Eucalyptus			Arôme pour boissons, sucreries, crèmes glacées	Anti-inflammatoire
Lemongrass				Vasodilatation, sédatif

Géranium	Parfum		Arôme pour sucreries, chewing-gum	Antispasmodique, relaxant
Menthe poivrée		Saveur pour dentifrice	Saveur pour liqueurs, glaces, chewing-gum, chocolat	Antalgique, anesthésique, tonique, stimulant du système nerveux
Menthe verte			Saveur pour boissons, sucreries, crèmes glacées	Saveur pour les sirops par exemple

Ces HEs agissent selon leur tropisme ; ce terme signifie que chaque huile exerce ses pouvoirs curatifs sur un organe ou une zone en particulier, ces substances volatiles pénètrent les tissus et l'organisme. Par exemple, l'HE de basilic est particulièrement actif au niveau de la digestion. Celle de cyprès améliore la circulation. Il est donc très important de se renseigner sur les effets thérapeutiques des HE car leur usage peut comporter des inconvénients. Par exemple, une HE de menthe des champs est indiquée pour stimuler les personnes fatiguées, elle soulage les douleurs névralgiques mais ne doit jamais être utilisée dans un bain, sous peine d'irritation sérieuse de la peau. Outre ces propriétés principales, elles ont toutes une vertu (Maach et Jemali, 1986).

10. La toxicité

« Ce n'est pas parce que c'est naturel que c'est sans danger pour l'organisme ». Selon la dose administrée ainsi que la voie d'exposition, par ingestion (souvent d'une grande quantité, et avec utilisation aléatoire), par contact (exposition à d'importantes concentrations), Les huiles essentielles peuvent être toxiques (Degryse *et al.* 2008).

D'après Piochon(2008), certaines huiles essentielles peuvent :

- Provoquer des irritations au niveau de la peau ;
- Etre allergène ;
- Photo-toxiques ;

- Avoir un effet neurotoxique ;
- Induire la formation de cancer tel que les dérivés d'allylbenzènes ou de propénylbenzènes.

Selon Bruneton (1999), généralement les huiles essentielles ont une toxicité aigüe par voie orale faible ou très faible, la majorité des huiles qui sont couramment utilisées ont une dose létale :

- (DL50) comprise entre 2 et 5 g/kg (Anis, Eucalyptus, Girofle...etc.) ;
- Ce qui est le plus fréquent, supérieure à 5 g/kg (Camomille, Lavande...etc.) ;
- (DL50) comprise entre 1 et 2 g /kg : Basilic, Estragon, Hysope (1,5ml/kg).
- Les plus toxiques sont les huiles essentielles de Boldo (0,13 g/kg) ;
- convulsions apparaissant dès 0,07 g/kg, de Chénopode (0,25 g/kg), de Thuya (0,83 g/kg), ainsi que l'essence de moutarde (0,34 g/kg).



*Chapitre II : Description des
plantes étudiées*

1. *Zingiber officinale* (gingembre)

1.1. Classification botanique

Le gingembre (*Zingiber officinale*) est une espèce de plante originaire d'Inde qui est classée comme suivant :

Tableau III : Classification botanique du gingembre (Favre et *al.* 2006 ; Gigon, 2012)

Nom commun	Gingembre, épice blanche, ginger, jenjanb
Nom latin	<i>Zingiber officinale</i> (Roscoe)
Règne	<i>Plantae</i>
Sous-règne	<i>Trachèobionta</i>
Division	Angiospermes
Classe	<i>Liliopsida</i>
Sous-classe	<i>Zingibéridéés</i>
Ordre	<i>Zingibérales</i>
Famille	<i>Zingibéracées</i>
Sous-famille	<i>Zingibéroidéés</i>
Genre	<i>Zingiber</i>
Espèce	<i>Zingiber officinale</i>



Figure 7: *Zingiber officinale* (Roscoe) (Gigon, 2012).

1.2. Description botanique

Le *Zingiber officinale* qui est une plante vivace herbacée, originaire des régions tropicales d'Asie (Braga *et al.* 2006).

La partie souterraine présente des rhizomes horizontaux, ramifiés, noueux, peau beige pâle et parfumée. Il devient de plus en plus fibreux avec l'âge. Ses feuilles présentent la partie aérienne qui sont pointues et longues de 20 cm. Elle possède deux sortes de tiges : tiges hautes stériles servent à l'assimilation et porte des fleurs alors que les basses tiges servent à la production qui ne porte pas de fleur (Faivre *et al.* 2006).



Figure 8 : Photographie du rhizome et feuilles du gingembre.

1.3. Domaine d'utilisation

Le gingembre a été utilisé dans la médecine pour traiter les rhumes, les maux de tête, les nausées, les troubles gastriques, la diarrhée, l'indigestion, l'arthrite, les affections rhumatismales et les douleurs musculaires. Il a été recommandé pour l'utilisation en tant que carminatif, diaphorétique, antispasmodique, expectorant, stimulant circulatoire, astringent, stimulant de l'appétit, anti-inflammatoire, diurétique et facilitant la digestion.

Le gingembre qu'il soit frais ou sec, réveille les gouttes avec son parfum citronné et piquant raison pour laquelle il est utilisé dans la cuisine comme épice.

2. *Rosmarinus officinalis* (romarin)

2.1. Classification botanique

Le romarin (*Rosmarinus officinalis*) est une espèce de plante des coteaux arides garrigues qui est classée comme suivant :

Tableau IV : classification botanique du romarin (Quezel et Santa, 1963).

Nom commun	Romarin, Encensier, Herbe aux couronnes, Rose des marins, Rose de la mer, Rose-marine
Nom latin	<i>Rosmarinus</i>
Règne	Plantes
Embranchement	Spermaphytes
Classe	Dicotylédones
Ordre	<i>Lamiales (labiales)</i>
Famille	<i>Lamiaceae</i>
Genre	<i>Rosmarinus</i>
Espèce	<i>Rosmarinus officinalis</i>



Figure 9 : *Rosmarinus officinalis* (Quezel et Santa, 1963).

2.2. Description botanique

D'après Coste (1937), le romarin est un arbrisseau de 50 cm à 1 mètre et plus. Toujours vert, très aromatique, très rameux, très feuillé ; feuilles persistantes, coriaces, sessiles, linéaires, entières, enroulées par les bords, vertes et chagrinées en dessus, blanches-tomenteuses en dessous ; fleurs subsessiles, rapprochées en petites grappes axillaires et terminales ; calice en cloche, bilabié, pulvérulent, nu à la gorge, à lèvre supérieure ovale entière, l'inférieure à 2 lobes lancéolés ; corolle bilabiée, à tube saillant, à lèvre supérieure en casque, bifide, l'inférieure à 3 lobes, le moyen très large et concave ; 2 étamines, à filets saillants, insérés à la gorge de la corolle, munis vers la base d'une petite dent ; anthères linéaires, à 1 loge ; carpelles obovales lisses. On reconnaît facilement le romarin à ses feuilles persistantes sans pétiole, coriaces, plus longues que larges, aux bords légèrement enroulés, vert sombre luisant sur le dessus, blanchâtres en dessous.



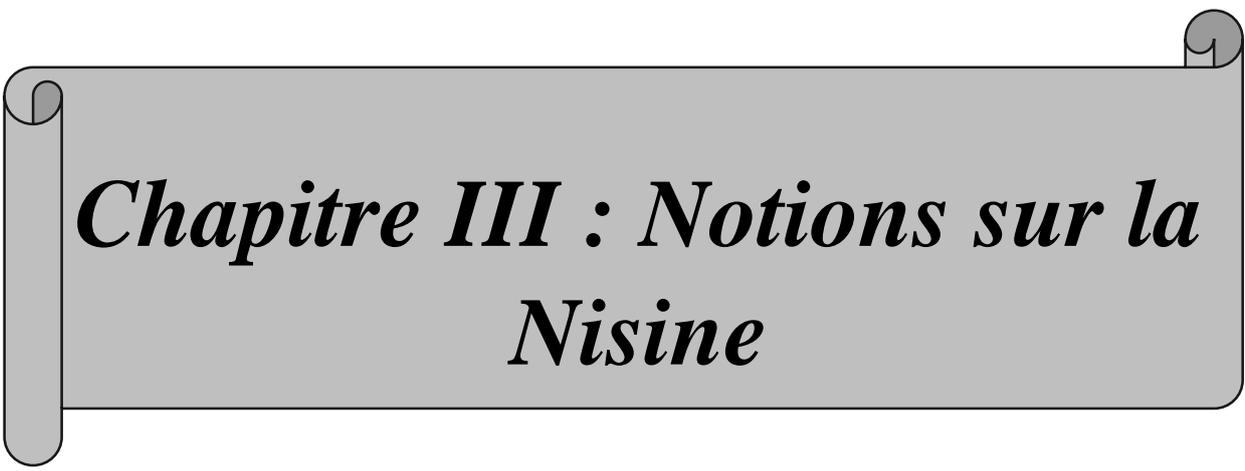
Figure 10 : Photo des feuilles, et des fleurs du romarin.

2.3. Domaine d'utilisation

Le romarin est souvent cultivé pour son huile essentielle. ses parties aériennes sont utilisées dans la médecine traditionnelle par voie orale pour soulager la colique rénale, activer les fonctions digestives, les dysménorrhées et comme antispasmodique. Il est considéré utile pour contrôler l'érosion du sol (Heinrich, 2006).

L'huile du romain a été largement répandue pendant des siècles, comme un des ingrédients en produits de beauté, utilisée comme épice culinaire pour l'assaisonnement et l'agro-alimentaire pour conservation des produits alimentaires (Arnold *et al*, 1997).

Elle est employée pour améliorer et stimuler la mémoire, de nos jours elle est utilisée par les étudiants en la brûlant dans leurs chambre en période d'examens (Boullard, 2010).



*Chapitre III : Notions sur la
Nisine*

1. Définition

La nisine fut découverte en 1928 par Rogers lorsqu'il s'aperçut qu'un métabolite produit par *Streptococcus lactis*, possédait une activité inhibitrice contre d'autres bactéries lactiques.

Elle appartient à la classe I des bactériocines (Klaenhammer, 1993). La nisine est un agent antimicrobien produit par quelques souches de *Lc. lactis sp* définie par TAGG *et al*, (1976) ayant une activité inhibitrice contre des souches phylogénétiquement proches de la souche productrice.

2. La structure et propriétés physico-chimique

La nisine est un peptide composé de 34 acides aminés de masse moléculaire comprise entre 2,1 et 3,5 KDa, qui comprennent des lantibiotique de types linéaire, cationique (Drider et Privost, 2009).

La nisine est sensible à la température, ainsi à PH5.0 et 6.8 perd respectivement 40 et plus de 90 % de son activité après un autoclavage à 115.6°C, alors qu'à PH 2 aucune diminution de l'activité n'est observée (Hurst, 1998).

3. la biosynthèse

Contrairement aux antibiotiques ou aux toxines qui sont synthétisées par la voie ribosomique, les Bactériocines sont directement synthétisées par la voie ribosomique, sous la forme polypeptidique ou de pré peptides (Jack *et al*. 1995).

Trois classes de transposons de taille de 70 kb contenant les gènes responsables de la synthèse de la nisine ont été identifiés chez *Lc. lactis sp*. (Makhloufi *et al*. 2011).

Les bactéries productrices de la nisine possèdent un gène qui leur confère une résistance contre l'action de leur propre bactériocine (Drider *et al*, 2006 ; Nes *et al*. 1996).

4. spectre d'Activité

Parmi toutes les bactériocines, la nisine possède un spectre d'activité très large. Elle possède une action inhibitrice sur les bactéries à gram positif ainsi que les cellules végétatives et des spores de *Clostridium* et *Bacillus*.

La nisine produite par des bactéries gram positif présente une activité inhibitrice contre les souches d' *Helicobacter pylori* et de *Neisseria* et de *Salmonella* en présence d'EDTA qui permet l'entrée de la nisine dans la paroi (Stevens *et al.* 1991), alors que en conditions normales n'ont pas d'effet bactéricide sur des espèces à gram négatif (Mota-meira *et al.*, 2000).

5. Mode d'Action

La membrane cytoplasmique des souches sensibles présente la première cible pour la nisine (Sahl *et al.*1998). Selon Drider et Privost, (2009) La nisine a une action contre un certain nombre de bactéries à Gram positif (*Listeria*, *Staphylococcus*, et *Mycobactérium*). Elle semble utiliser deux modes d'action en fonction de sa concentration dans le milieu :

- Elle se lie aux lipides complexes (phospholipides), inhibe la synthèse de la paroi cellulaire ;
- Forme des pores au niveau de la membrane cytoplasmique de la souche cible comme *Staphylococcus aureus* en l'occurrence et donc la dépolariser (figure11).

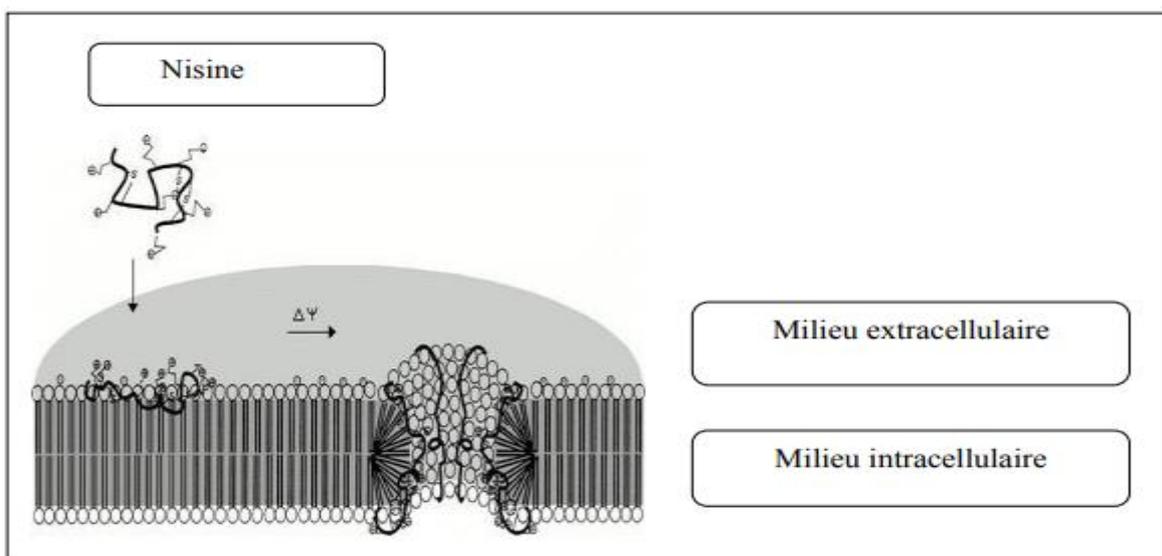


Figure 11 : Modèle de formation d'un pore transmembranaire par la nisine (Sahl *et al.* 1998).

Contrairement aux Gram positifs Les bactéries à Gram négatif telles que *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* et *Serratia marcescens* sont résistantes aux antibiotiques et en particulier à la nisine. Cette résistance a été attribuée à la membrane externe riche en lipopolysaccharide qui empêche les bactériocines d'accéder au pentapeptide du lipide II présent dans la membrane cytoplasmique (Chatterjee *et al.* 2006).

6. Toxicité

La nisine est dégradée par certaines enzymes protéolytiques, ce qui lui confère sa non-toxicité. En effet c'est la seule bactériocine autorisée comme additif alimentaire (Turtell et Delves-Broughton, 1998). En plus de la faciliter de la dégradation de la nisine par les enzymes digestives, elle ne génère pas des produits toxiques (Hurst, 1981). Ainsi la nisine a été approuvée pour des utilisations spécifiques dans différents produits alimentaires dans 50 pays dont les Etats Unis (Turtell et Delves-broughton, 1998).

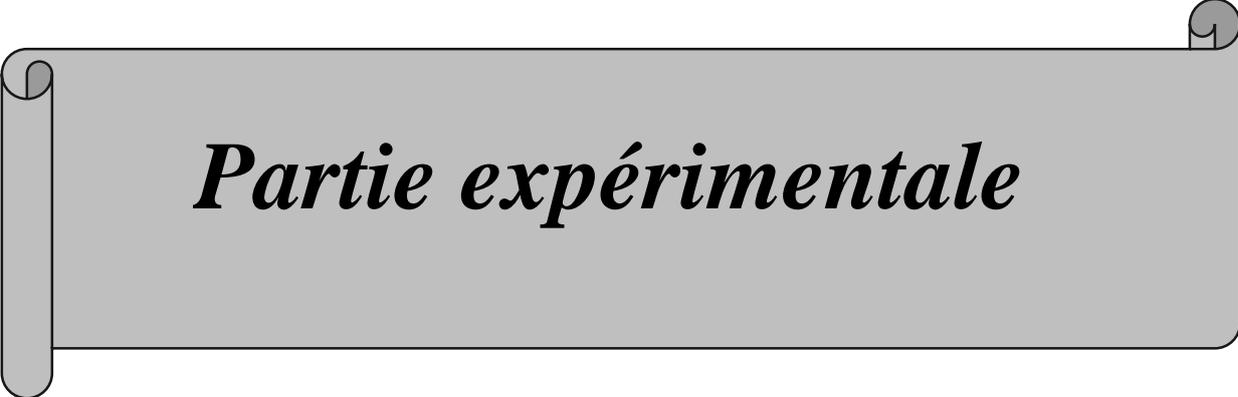
7. Rôle et conservation des aliments

La nisine est la plus connue et la seule bactériocine acceptée comme bio-ingrédient dans les aliments. L'efficacité de la nisine est meilleure dans le cas où la charge des contaminants n'est pas élevée et est dépendante de la qualité des aliments (Daoudi, 2000).

D'après Wajid et Kaln (1976), les échantillons du lait stérilisés et traités avec la nisine ont pu être conservés six mois à 37°C et trois semaines à 55°C.

Sans qu'un traitement de réfrigération la nisine est efficace contre les cellules végétatives ou les spores des bactéries contaminants (Hirsch et Grinsted 1951).

Elle est utilisée dans des fromages et produits fromagers, des crèmes, des gâteaux, des œufs transformés et ovoproduits, etc. On l'utilise aussi dans les viandes, et mise en conserve des viandes pour inactiver les bactéries nuisibles, ainsi que comme antimicrobien dans les produits cosmétiques. La nisine peut être associée à l'EDTA pour un plus large spectre antibactérien.



Partie expérimentale



Matériel et méthodes

Le travail a été réalisé au laboratoire de microbiologie, Faculté des Sciences Biologiques et Sciences Agronomiques. Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

1. Matériel

1.1. Appareillage

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

1.2. Micro-organismes

Les souches bactériennes utilisées dans notre travail sont référenciées appartiennent à l'**American type culture collection** (ATCC) ainsi que des souches fongiques fournissaient par le laboratoire pédagogique de microbiologie de l'UMMTO qui sont représentées comme suivant :

Tableau V : les souches bactériennes testées.

Souches bactériennes	Type de Gram	Souches fongiques
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Gram négatif	<i>Aspergillus niger</i> (champignon)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	Gram positif	
<i>Bacillus cereus</i> ATCC10876	Gram positif	<i>Candidat albicans</i> (levure)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	Gram négatif	

1.3. Les milieux de culture

Les milieux de culture utilisés sont les suivants :

- Gélose nutritive (GN) (HIMEDIA Inde)
- Gélose Muller Hinton (MH) (Laboratoire CondaPronadisa, Espagne)
- Milieu liquide : Brain Heart Infusion Broth (BHIB) (Laboratoire CondaPronadisa, Espagne)
- Potato Dextrose Agar (PDA) (préparé par nous mémé)
- Gèlose Sabouraud (Matériel médico-chirurgical (MMDEC), Tizi-Ouzou).

1.4. Les Antibiotiques et Antifongique utilisés

1.4.1 Les Antibiotique

- FOX(Cèfoxitine) (bio-analyse)
- CXT(Céfotaxime) (bio-analyse)
- AX (amoxicillin) (bio-analyse)
- K (kanamycine) (HIMED)

L'Ensemble des antibiotiques ont été fournis par laboratoire de microbiologie UMMTO.

1.4.2 L'Antifongique

- Amphotéricine B (Fungizone®)

L'Antifongique a été acheté par nous-même au sein de la pharmacie BOUDARENNE Tizi-Ouzou.

1.5. Les huiles essentielles Testées

Les deux huiles utilisées ont été fournies aimablement par notre promoteur Mr OUELHADJ. Elles sont à 100% pures et d'origines naturelles.

Tableau VI : Les huiles essentielles testées.

Huiles essentielles	Nom latin	Provenance	Contrôle
Gingembre	<i>Zingiber officinale</i> (<i>Roscoe</i>)	Laboratoire Pierre Fabre, France	Certifié par ECOCERT
Romarin	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Laboratoire Pierre Fabre, France	Certifié par ECOCERT

1.6. La9 bactériocine utilisés

La bactériocine est la nisine qui a été fournie aimablement par notre promoteur Mr OUELHADJ sous forme de poudre. Elle provient de la compagnie Sigma-Quimica,S.A.(Espagne) et elle a été isolée de *Lactococcus lactis* (E234 ; CAS number 1414-45-5, formule chimique : C₁₄₃H₂₃₀N₄₂O₃₇S₇), avec une masse moléculaire de 3354,12 Da.

Son utilisation dans notre travail a nécessité une dilution dans l'HCL à 0.02N de façon à obtenir une concentration de 1.5mg/ml (Kheddor *et al.* 2003).

1.7. L'Emulsifiant utilisé

Pour avoir une meilleure diffusion des huiles essentielles dans les milieux de culture, nous avons utilisé un solvant organique polaire qui est le diméthyle sulfoxyde (DMSO).

2. Méthodes

2.1. Préparation du milieu de culture

Le choix de l'utilisation du milieu de culture est porté sur le milieu **Muller-Hinton** qui est un milieu gélosé transparent simple servant à la culture de différents types de bactéries. Le milieu de culture PDA favorise la croissance rapide des moisissures qui ont été coulées dans des boîtes de pétri après leurs autoclavages.

Un autre milieu est choisi, le BHIB qui est un milieu liquide utilisé pour l'enrichissement des souches bactériennes, qui ont été réparties dans des tubes stériles puis autoclavées.

2.2. Vérification de la pureté des souches bactériennes et préparation de l'inoculum

A partir des souches de 48h procurées dans laboratoire de microbiologie, un repiquage des souches bactériennes (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*) a été réalisé sur des boîtes pétri contenant le milieu MH, suivi d'une incubation à 37°C pendant 24h Afin d'obtenir des souches jeune. Une coloration de gram suivie d'une observation microscopique à l'huile d'émersion au grossissement 1000 a été réalisée dans le but d'observer le mode de regroupement, la forme des cellules bactériennes ainsi que le type de gram.

Le protocole suivi dans la coloration de gram a été décrit par Delarras (2007) :

- A partir d'une colonie bactérienne isolée, un frottis a été réalisé sur une lame en verre contenant une goutte d'eau distillé ;
- Le prélèvement a été déposé au milieu de la lame en faisant des rotations ;
- Fixation du frottis avec un passage de la lame directement 3 fois dans la flamme du bec Bunsen ;
- Coloration au violet de Gentiane (colorant basique) laissé agir pendant 1minute puis rincer à l'eau ;
- Etaler le lugol et laisser agir 1minute puis Rincer à l'eau
- Décoloration à l'alcool : verser goutte à goutte l'alcool sur la lame laisser agir 20secondes puis rincer à l'eau ;
- Coloration avec de la Fuchsine laisser agir 1minute (contre coloration), puis rincer doucement à l'eau ;
- Sécher à l'aide d'une flamme d'un bec bunsen ;
- Observation au microscope optique à l'objectif 100 (à l'huile d'émersion).

Les Bactéries à Gram positif sont colorées en violet alors que les bactéries à Gram négatif sont en rose.

Après vérification des souches microbienne (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*) la préparation des suspensions microbiennes a été réalisée pour chaque espèce. A l'aide d'une pipette Pasteur nous avons prélevé deux ou trois colonies pures et bien isolées ; qu'on décharge dans un tube contenant 10ml d'eau physiologique stérilisée. La suspension bactérienne a été standardisée à une densité optique (DO) de 0,08 à 0,1 grâce à un spectrophotomètre réglé à une longueur d'onde de 625 nm. Cette DO correspond à une concentration de 10^7 UFC/ml.

2.3. Etude de l'activité antibactérienne des extraits utilisés (deux huiles essentielles et la nisine)

2.3.1. Teste de sensibilité aux huiles essentielles

La méthode d'aromatogramme a été utilisée pour évaluer l'activité antimicrobienne des deux huiles essentielles, cette méthode est basée sur la diffusion des disques de papier Whatman imprégnés d'huile essentielle sur gélose (MH).

La méthode a été réalisée comme suit :

- Des boîtes pétri contenant du milieu MH stérile et solide ont été ensemencées avec 100 μ l de la suspension bactérienne, puis étalées à l'aide d'un râtelier de pipette Pasteur. Des disques de papier Whatman (6 mm) stériles ont été imbibés de 10 μ l d'une préparation d'huile essentielle additionnée de DMSO à raison de 5% (V/V). Laisse sécher pendant quelques secondes, puis les déposer au centre des boîtes. L'incubation des boîtes a été effectuée à 37 °C pendant 24 h à l'étuve.

Témoin négatif a été réalisé par dépôt de disques de papier Whatman imprégnés de 10 μ l de DMSO au milieu des boîtes préalablement ensemencées avec une suspension bactérienne standardisée.

Témoin positif a été réalisé par dépôt de 4 disques d'antibiotiques.

Tous les essais ont été répétés deux fois.

Après l'incubation de 24h l'activité antimicrobienne a été déterminée en mesurant à l'aide d'un pied à coulisse les zones d'inhibition autour de chaque disque.

Les résultats de cette activité sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peuvent être symbolisés par des croix. La souche ayant un diamètre :

- $D < 8\text{mm}$: Souches résistantes (-).
- $9\text{mm} \leq D \leq 14\text{mm}$: Souches sensibles (+).
- $15\text{mm} \leq D \leq 19\text{mm}$: Souches très sensibles (++) .
- $D > 20\text{mm}$: Souches extrêmement sensibles (+++) (Ponce *et al.* 2003).

2.3.2. Teste de sensibilité au bactériocine (nisine)

L'Activité de la nisine a été mise en évidence par la méthode de L'antibiogramme. la solution de la nisine a été utilisé on imprégnant des disques de papier Whatman avec 10 µl en suite les déposé au centre de chaque boite de Pétri préalablement ensemence avec la suspension standardisée. Les boites incubées à 37°C pendant 24h.

Témoin négatif a été réalisé par dépôt de disques de papier Whatman imprégnés de 10µl d'HCL au centre des boites préalablement ensemencées avec une suspension bactérienne standardisée.

Témoin positif a été réalisé par dépôt de 4 disques d'antibiotiques.

Tous les essaies ont été répété deux fois.

Après l'incubation de 24h, l'activité antimicrobienne de la nisine a été déterminée de la même façon que celle citées précédemment dans l'aromatogramme.

2.3.3. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice

La concentration minimale inhibitrice correspond à la plus faible concentration qui permet l'inhibition de la croissance bactérienne.

La détermination de la CMI s'est effectuée selon la méthode des macros dilutions, qui consiste à réaliser une gamme décroissante de concentration en HE dans des tubes contenant un milieu liquide (BHIB) ainsi qu'une quantité de suspension bactérienne standardisée, cette technique s'effectue comme suit : 450µl de l'HE à tester supplémentée en DMSO (5% V/V), sont placés dans un tube stérile contenant 3,55 ml du milieu BHIB. Ce tube correspond à la solution mère à partir de laquelle des dilutions sont réalisées. Une dilution de demi en demi est réalisée, de manière à obtenir une gamme de concentration comprise entre 56.25et 0,11µl/ml pour cela nous avons besoin de 10 tubes où à chaque fois il faut prélever 2ml d'un tube et les verser dans le tube suivant ainsi jusqu'au 10ème tube, prélever 2ml et les jeter. Les valeurs de dilution sont résumées dans le tableau suivant :

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

Rapport de dilution de l'H.E	S M Solution mère	10⁻¹ Tube 1	10⁻² Tube 2	10⁻³ Tube 3	10⁻⁴ Tube 4	10⁻⁵ Tube 5	10⁻⁶ Tube 6	10⁻⁷ Tube 7	10⁻⁸ Tube 8	10⁻⁹ Tube 9	10⁻¹⁰ Tube 10
%	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,5	0,78	0,4	0,2	0,1
µl H.E/ml	113	56,5	28,25	14,12	7,06	3,53	1,76	0,88	0,44	0,22	0,11

Une fois les dilutions réalisées, 10µl d'un inoculum bactérien standardisé à 10⁶ UFC/ml dans ont été additionné a chacun des tubes de la gamme de dilution ainsi que le tube contenant la solution mère. Un témoin de la croissance bactérienne (témoin positif) est réalisé par ajout de 10µl de la suspension bactérienne standardisée dans un tube contenant 2ml de BHIB supplémenté en DMSO (5% V/V), ainsi qu'un témoin négatif a été réalisé par l'ajout de 10µl de DMSO dans un tube contenant 2ml de BHIB.

Incubation de l'ensemble des tubes à 37°C pendant 24h, puis observation de la présence ou l'absence de croissance bactérienne à l'œil nu (apparition d'un trouble ou pas).

D'après Koba *et al.* 2004, le pouvoir antibactérien d'une huile essentielle vis-à-vis d'une souche peut-être classé comme suivant :

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

2.4. Etude de l'effet combiné des huiles essentielles et avec la nisine

2.4.1. Test de sensibilité vis-à-vis la combinaison des deux huiles essentielles

Afin de mettre en évidence l'effet combiné entre les deux HEs *Zingiber officinale* et *Rosmarinus officinalis* des combinaisons entre les deux huiles à trois différentes concentrations ont été réalisées puis émulsifiées dans le DMSO (5% V/V) :

1. 25% d'huiles de gingembre +75% d'huile de romarin ;
2. 50% d'huiles de gingembre +50% d'huile de romarin ;
3. 75% d'huiles de gingembre +25% d'huile de romarin.

Les disques imbibés de 10 μ l de chaque concentration sont déposés sur des boîtes de pétri préalablementensemencées avec une suspension bactérienne standardisée.

Témoin négatif et Témoin positif ont été réalisés par dépôt de disques de papier Whatman imprégnés de 10 μ l de DMSO et de 4 disques d'antibiotiques respectivement au centre des boîtes préalablementensemencées avec une suspension bactérienne standardisée.

Tous les essais ont été répétés deux fois

Après l'incubation de 24h une lecture a été faite comme site précédemment dans l'aromatogramme.

D'après Pibiri (2005), il existe quatre effets antimicrobiens de l'association des HEs,

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

2.4.2. Test de sensibilité vis-à-vis la combinaison des deux huiles essentielles et la nisine

Afin de mettre en évidence l'effet combiné entre les deux HEs *Zingiber officinale*, *Rosmarinus officinalis* et la nisine, des combinaisons l'huile-nisine à trois différentes concentrations ont été réalisées comme suit :

1. 25% d'huile+75% de nisine ;
2. 50% d'huile +50% de nisine ;
3. 75% d'huile +25% de nisine.

La combinaison a été faite pour les deux huiles essentielles.

Le protocole suivie est le même avec celui utilisé dans le titre précédant.

2.5. Etude de l'activité antifongique des deux huiles essentielles et la nisine

Deux souches pures qui sont *Aspergillus niger* (moisissure) et *Candida albicans* (levure) ont été utilisées au cours de notre travail.

2.5.1. Préparation de la suspension fongique

Après le repiquage de nos souches dans des boites de pétri contenant le milieu SAB pour *candidat albicans* et le milieu PDA pour *Aspergillus niger* la préparation des suspensions fongiques ont été faites comme suivant :

2.5.1.1. *Candida albicans*

Dans le cas de *Candida albicans*, nous réalisons une suspension de la levure dans 10 ml d'eau physiologique, que nous avons standardisé par spectrophotomètre à une longueur d'onde de 625nm pour l'obtention d'une suspension de 10^7 UFC/ml qui correspondant à une D.O comprise entre 0,08 et 0,1. le même protocole site dans l'aromatogramme a été suivi ainsi que la lecture après incubation à 30°C pendant 72h.

2.5.1.2 *Aspergillus niger*

Dans le cas d'*Aspergillus niger* un comptage des spores sur la cellule de Malassez a été réalisé après prélèvement des spores jeunes (culture de 3 jours) dans 10 ml d'eau physiologique.

Après avoir standardisé la suspension à 10^7 spores/ml, nous avons prélevé 100µl de la suspension à l'aide d'une micropipette sur milieu PDA puis étalé à l'aide d'une pipette pasteur (râteau), les boites sont incubées à 30°C pendant 72h. Après incubation sur la boite de gélose nous avons ensuite prélevé des disques de gélose contenant d'*Aspergillus niger* que nous avons déposé dans des boites pétri contenant 15ml de milieu PDA mélangé a trois différentes concentration (15,20,25µl) de nos huiles et nisine. la lecture a été faite après incubation à 30°C pendant 72h et le suivi de la croissance du champignon pendant une durée de 5jours.



Figure 12 : photo représentative de l'étape de prélèvement des disques de gélose tapissé d'*Aspergillus niger*.

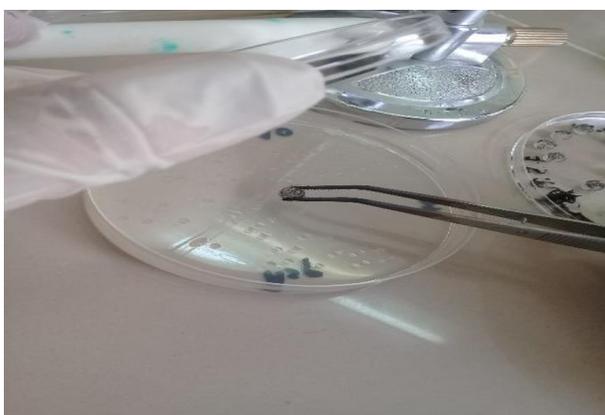


Figure 13 : photo représentative de l'étape de dépôt des disques de gélose tapissé d'*Aspergillus niger*.

D'après Kordali *et al.* (2003) les taux d'inhibition de la croissance par apport au témoin, sont calculés selon la formule suivante :

$$TI(\%)=100x (dC-dHE)/dC$$

TI(%) = taux d'inhibition exprimé en pourcentage.

dC : diamètre de colonies dans les boites du témoin positif - ddi (mm).

dHE : diamètre de colonies dans les boites contenant l'huile essentielle - ddi (mm).

ddi : diamètre de disque initiale (3mm).



Résultats et discussion

II. Résultats et Discussion

1. Résultats des tests de vérification des souches bactériennes

Après coloration de Gram et observation microscopique les caractères morphologiques des souches étudiées sont comme suivant :

Tableau VIII : Caractères morphologiques des souches bactériennes étudiées.

Espèce bactérienne	Milieu de culture	Gram	Aspect microscopique
<i>E.coli</i> (ATCC 25922)	MH	Négatif	Coccobacille de colleur rose
<i>P.aeruginosa</i> (ATCC 727853)	MH	Négatif	Bacille de colleur rose
<i>S.aureus</i> (ATCC 25923)	MH	Positif	Cocci en grappe de raisin de colleur violet
<i>B.cereus</i> (ATCC 10876)	MH	Positif	Bacilles de colleur violet

2. Résultats de l'activité antibactérienne de deux huiles essentielles et la nisine

2.1. Résultats des témoins négatifs

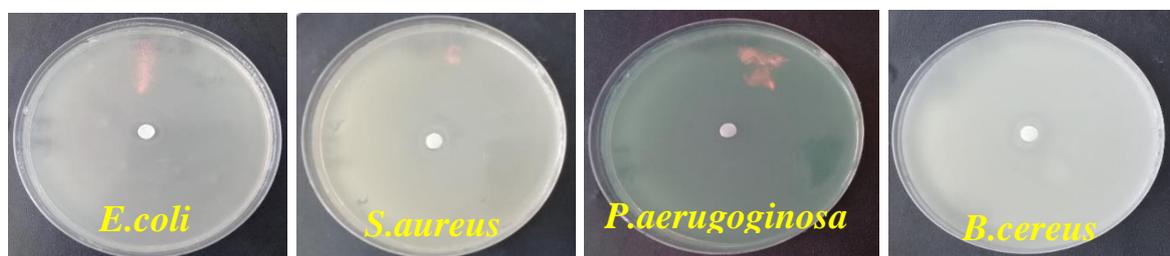


Figure14 : Photographies des témoins négatifs réalisés avec la solution d'HCl de N=0,02 sur les bactéries testées.

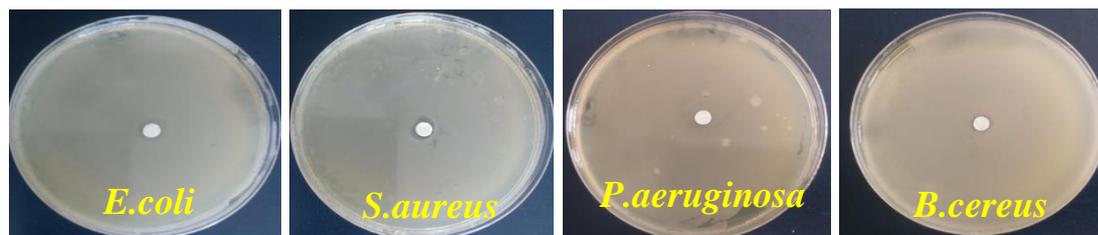


Figure15 : Photographies des témoins négatifs réalisés avec DMSO sur les bactéries testées.

Le DMSO et l'HCl n'ont aucune activité antibactérienne, donc la zone d'inhibition autour de disque imbibé par DMSO et HCl, est totalement absente.

2.2. Résultats des témoins positifs

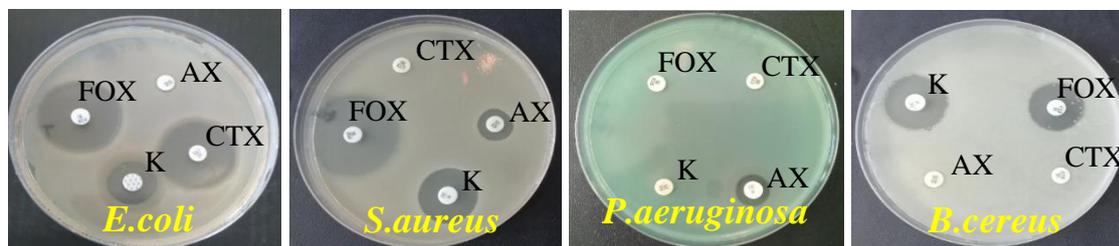


Figure 16 : Photographies des témoins positifs réalisés avec 04 antibiotiques sur les quatre souches.

Les zones d'inhibitions ainsi que la résistance ou la sensibilité aux antibiotiques des souches bactériennes sont présentées dans le tableau suivant :

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

		Diamètres d'inhibition en (mm) et en moyenne des deux essais \pm l'écart type			
Souche	ATB	Céfoxitine (FOX)	Amoxiciline (AX)	Céfotaxime (CTX)	Kanamycine (K)
	<i>E.coli</i>		28,32 \pm 02,25	09,11 \pm 01,72	06,00 \pm 00,00
<i>S.aureus</i>		30,21 \pm 00,06	10,60 \pm 02,71	06,00 \pm 00,00	19,71 \pm 0035
<i>P.aeruginosa</i>		06,00 \pm 00,00	06,00 \pm 00,00	06,00 \pm 00,00	11,26 \pm 00,01
<i>B.cereus</i>		18,33 \pm 00,28	06,00 \pm 00,00	06,00 \pm 00,00	21,05 \pm 00,42

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

D'après les résultats nous constatons que les bactéries testées présentent une sensibilité ou une résistance différente vis-à-vis des antibiotiques utilisés. Toutes les Bactéries testées s'avère résistante a la Céfotaxime et sensible à la Kanamycine et céfoxitine à l'exception de *P.aeruginosa* qui est résistante a ce dernier.

E.coli et *S.aureus* ont montré une sensibilité à l'Amoxiciline au moment où *P.aeruginosa* et *B.cereus* montrent une résistance à ce dernier.

On remarque que la résistance ou la sensibilité des souches aux ATB diffèrent en fonction de la souche et de l'Antibiotiques utilisé.

2.3. Résultats du test de sensibilité aux huiles essentielles

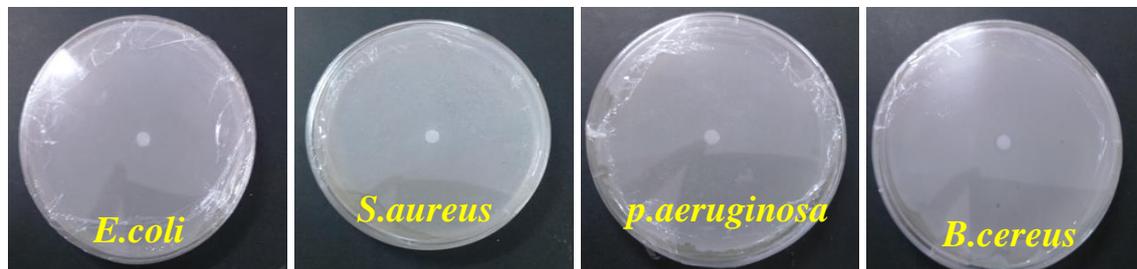


Figure 17 : Effet de l'H.E de Gingembre sur les quatre souches bactériennes testées.

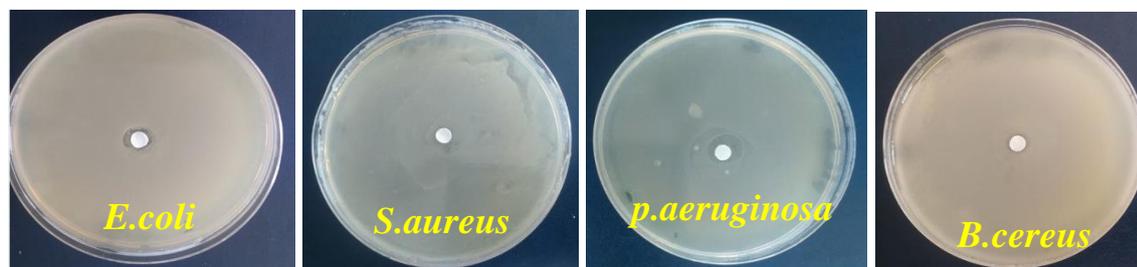


Figure 18 : Effet de l'H.E de Romarin sur les quatre souches bactériennes testées.

Les diamètres des zones d'inhibition ainsi que la sensibilité des souches bactérienne aux deux huiles essentielles sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau X : Résultats des diamètres d'inhibition en mm (moyenne \pm l'écart type) de l'activité antimicrobienne de deux huiles essentielles sur les quatre bactéries testées.

Souche \ HEs	<i>Zingiber Officinale</i>	Sensibilité	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Sensibilité
<i>E.coli</i>	06,00 \pm 00,00	(-)	07,25 \pm 01,47	(-)
<i>S.aureus</i>	06,00 \pm 00,00	(-)	06,00 \pm 00,00	(-)
<i>P.aeruginosa</i>	06,00 \pm 00,00	(-)	13,25 \pm 08,46	(+)
<i>B.cereus</i>	06,00 \pm 00,00	(-)	06,00 \pm 00,00	(-)

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

D'après le tableau 9 les résultats de l'activité antibactérienne de deux HEs gingembre et romarin testées a une concentration de 10 μ l, montrent que l'huile de romarin a un effet positif

important vis-à-vis la souche *P.aeruginosa* avec une zone d'inhibition de 13,25mm .Par contre elle ne représente aucun effet sur les souches *E.coli*, *S.aureu* et *B.cereus*. De même l'huile de gingembre ne présente aucune activité sur les 4 souches.

Tout d'abord nos résultats sont en accord avec ce trouvés par Beddou (2016), qui a étudié l'activité antibactérienne d'extraits des plantes médicinales, n'a trouvée aucune activité antimicrobienne de l'extrait de gingembre sur les souches testées qui sont *S. aureus*, *E.faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*. Par contre une activité antifongique remarquable vis-à-vis de *Candida albicans* où la zone d'inhibition était de 12,0mm a été trouvée par (Sasidharan *et al.* 2010).

Une étude récente de Ponmurugan Karuppiah *et al.*, (2012). Quant à eux, se sont intéressés à l'activité antibactérienne de l'HE de gingembre. *Klebsiella sp*, *Enterobacter sp*, *E. coli*, *Bacillus sp*, *Proteus sp*, *S. aureus*, et *Pseudomona aeruginosa* se sont révélés sensibles à l'action de l'HE de gingembre avec des CMI respectivement de 185,58 ; 185,50 ; 75,60 ; 74,50 ; 70,20 ; 68,45 et 67,00µg/ml.

De nombreuses études in vitro ont montré que l'extrait de gingembre poudre dans l'éthanol inhibe la croissance des bactéries de Gram (+), (*S. aureus* et *B. subtilis* sauf *S. epidermidis*), par contre il n'inhibe pas la croissance des bactéries de Gram (-), (*E.coli*).

L'extrait de gingembre possède une activité antibactérienne, Ceci s'explique mieux par les résultats de Malu *et al.*, (2008) et que l'inhibition de la croissance bactérienne était dépendant de la dose.

L'inactivité trouvée dans notre travail, est due probablement à plusieurs facteurs, parmi lesquels :

- Le procédé et les conditions d'extraction
- La nature du matériel d'extraction (risque d'oxydation)
- Les conditions de conservation, de stockage et de transport ;
- La concentration en huiles utilisée ;
- La diffusion des huiles à travers la gélose ;
- L'état physiologique de la bactérie, etc.

Concernant l'huile de romarin aucune activité n'a été détectée vis-à-vis *E.coli* *S.aureus* et *B.cereus*, contrairement aux travaux de Benikhlef, (2014) qui a détecté une activité

remarquable vis-à-vis les deux souches *E.coli* et *S.aureus* avec des zones d'inhibition de 12mm et 9mm respectivement et la dilution de l'huile a montré que *E.coli* est plus sensible.

D'autre part, Plusieurs travaux ont mis en évidence la grande sensibilité des bactéries Gram (+) par rapport aux Gram (-) (Bouzouta *et al.* (2008). Néanmoins, Certaines études révèlent aucune activité antimicrobienne sélective vis-à-vis les bactéries Gram (+) ou Gram (-) (Guesmi et Boudabous, 2006).

Selon les résultats de Mouas *et al.*, (2017) l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* des deux régions Blida et Djelfa possède une bonne activité contre les bactéries *S.aureus* et *E.faecalis* avec respectivement un diamètre de 23,75 mm et 22,75 mm pour Blida et 16,75 mm et 14,25 mm pour Djelfa .et le même diamètre trouvé pour *B.cereus* et *E.coli* qui sont respectivement 11,75 mm et 9,5 mm pour les deux régions. Avec respectivement un diamètre de 23,75 mm et 22,75 mm pour Blida et 16,75 mm et 14,25 mm pour Djelfa. Par contre à ces deux souches, on a trouvé les mêmes diamètres pour *Bacillus cereus* et *Escherichia coli* qui ont respectivement 11,75 et 9,5 mm à l'exception de *Pseudomona aeruginosa* qui est résistant à ces extraits.

Dans notre travail une activité importante a été marqué avec l'huile de *Rosmarinus officinalis* vis-à-vis *Pseudomona aeruginosa* avec le diamètre de 13.5mm qui est une bactérie Gram- résistante a trois antibiotique(FOX,CTX et K),cependant *Zingiber officinale* n'exerce aucune activité envers la souche.

Cette divergence entre nos résultats et ceux des autres travaux peut être attribuée aux constituants de la plante prenant en considération le lieu et la période de récolte ou probablement dans le fait que dans notre travail nous avons testé une huile végétale commerciale, alors que les autres huiles de romarin testées dans d'autres travaux sont pour la plupart des huiles extraites par un ou plusieurs solvants volatils.

La faible activité antibactérienne des huiles essentielles peut être expliquée par les faibles pourcentages en composés majoritaires actifs (α pinène, 1.8 cinéole, linalol, borneol) et même l'absence de certains composés (β -pinène).

2.4. Résultats du test de sensibilité au bactériocine (nisine)

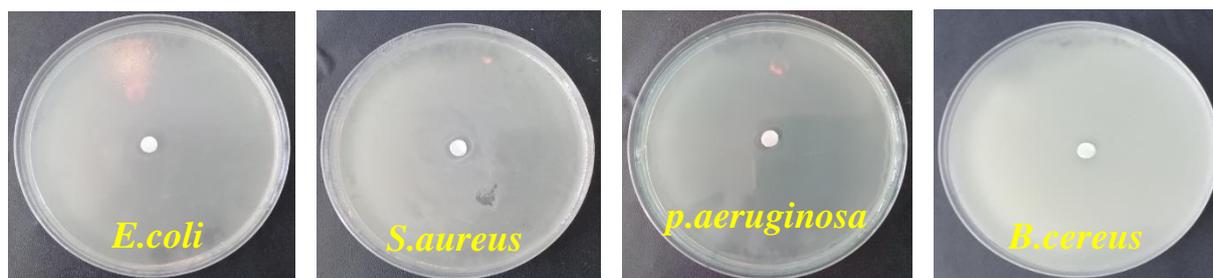


Figure 19 : Effet de la nisine sur les quatre souches bactéries testées.

Le diamètre des zones d’inhibition ainsi que la sensibilité des souches bactérienne vis-à-vis la nisine sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau XI : Résultats des diamètres d’inhibition en mm (moyenne ± l’écart type) et la sensibilité de la nisine sur les quatre souches bactériennes testées.

Souche	Nisine	La sensibilité
<i>E.coli</i>	09,16 ±01,49	(+)
<i>S.aureus</i>	07,45 ±01,78	(-)
<i>P.aeruginosa</i>	07,13 ±01,89	(-)
<i>B.cereus</i>	06,00 ±00,00	(-)

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

D’après les résultats montrés par le tableau 11, il ressort que la nisine a une faible activité vis-à-vis les souches étudiées *E.coli* avec des zones d’inhibition de 9,16mm et aucune activité n’a été détecté vis-à-vis *S.aureus*, *P.aeruginosa* et *B.cereus*.

En général, les bactériocines des bactéries lactiques ne sont pas actives contre les bactéries à Gram négatif. Ceci est dû à la différence dans la composition de l’enveloppe cellulaire des bactéries Gram positives et Gram négatives. Toutefois, certaines études ont suggéré qu’un changement des propriétés de perméabilité de la membrane externe suite à certains traitements utilisés (l’ajout de l’EDTA, lysozyme...) en combinaison avec des bactériocines ou encore des conditions de stress rendraient les bactéries Gram négatives sensibles aux bactériocines. Cependant, le spectre d’activité des quelques bactériocines (comme la nisine) selon Klaenhammer (1993), peut ne pas être restreint aux espèces proches taxonomiquement ou même occupant la même niche écologique que la bactérie productrice.

Dans les références consultées on remarque que l’utilisation de la nisine pour la conservation des aliments est généralement combinée avec d’autres substances.

L'amélioration de l'activité antibactérienne contre les bactéries Gram - insensibles aux bactériocines de bactéries lactiques, les bactériocines ont été associées à d'autres composés pour améliorer les durées de conservation des aliments. Par exemple, 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 (Carneiro *et al.* 1998 et Sebti *et al.* 2002).

Sebti *et al.* (2002) ont recherché l'effet combiné éventuel de la nisine et de deux bactériocines (la pédiocine et la curvaticine). L'effet des deux bactériocines sur les phases de latence de *L. monocytogenes*, Aux concentrations testées, les temps de latence après addition de bactériocines sont augmentés d'un facteur 4,5 et 10 respectivement pour la pédiocine, la nisine, et pour la curvaticine. L'association des bactériocines permet quant à elle d'améliorer les temps d'inhibition d'un facteur 6 et 13 pour respectivement la nisine-pédiocine et la nisine curvaticine. La curvaticine apparaît être la plus efficace en terme d'amélioration des temps d'inhibition, avec un retard de l'ordre de 2 jours de la croissance bactérienne, lorsque la curvaticine est associée à la nisine. Selon cet auteur, en accord avec plusieurs études bibliographiques, l'association de bactériocines a toujours montré un effet de synergie qui améliore l'activité antibactérienne des bactériocines sur *L. monocytogenes* (Hanlin *et al.* 1993, Katla *et al.* 2001).

Contrairement à nos résultats, les résultats trouvés par Ouelhadj *et al.* (2017), révèlent positifs sur toutes les bactéries testées avec des zones d'inhibition très importantes avec la nisine, 24,5 ; 23 et 21,5 mm pour les bactéries *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* (ATCC 4330) et *Pseudomonas aeruginosa*, respectivement et 13,5 ; 18 et 12,5 mm vis-à-vis *Escherichia coli* (ATCC 2592), *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*, respectivement.

De même les résultats d'El Moualdi *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 négatif sont plus importants pour *Escherichia coli* ($\emptyset = 24,3$ mm), *Klebsiella pneumoniae* ($\emptyset = 22,1$ mm) et *Pseudomonas aeruginosa* ($\emptyset = 21,2$ mm).

La résistance à la nisine a été mise en évidence par Harris *et al.* (1991) chez certaines types de bactéries telles que *Streptococcus thermophilus* et *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 La résistance à la nisine a

été aussi liée à la rigidité des membranes bactériennes et à leur faible taux de lipides chargés négativement (Crandell et Montville, 1998).

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

3. les résultats des effets antibactériens des combinaisons

3.1. Les résultats de la combinaison des huiles essentielles

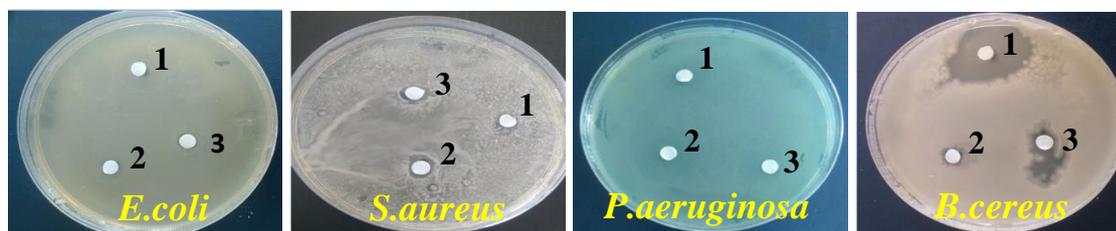


Figure 20 : Résultat de la combinaison des deux huiles essentielles *Zingiber officinale* et *Rosmarinus officinalis* a trois concentrations différentes sur les quatre bactéries testées.

1. 25% d'huiles de gingembre +75% d'huile de romarin ;
2. 50% d'huiles de gingembre +50% d'huile de romarin ;
3. 75% d'huiles de gingembre +25% d'huile de romarin.

Le tableau suivant regroupe les diamètres des zones d'inhibition de la combinaison de deux huiles essentielles *Zingiber officinale* et *Rosmarinus officinalis* sur les quatre bactéries testées.

Tableau XII : Tableau récapitulatif des résultats de la combinaison de deux huiles essentielles *Zingiber officinale* et *Rosmarinus officinalis* à trois concentrations différentes sur les quatre bactéries testées.

Souche	Diamètres d'inhibition (mm) en moyenne des deux essais \pm l'écart type		
	<i>Zingiber officinale</i> + <i>Rosmarinus officinalis</i>		
	1	2	3
<i>E.coli</i>	06,00 \pm 00,00	06,00 \pm 00,00	06,00 \pm 00,00
<i>S.aureus</i>	06,40 \pm 00,56	14,31 \pm 01,71	11,23 \pm 03,08
<i>P.aeruginosa</i>	06,00 \pm 00,00	06,00 \pm 000,0	06,00 \pm 00,00
<i>B.cereus</i>	19,70 \pm 07,80	16,48 \pm 05,02	13,71 \pm 03,69

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

1. 25% d'HE de *Zingiber officinale* + 75% d'HE de *Rosmarinus officinalis* ;
2. 50% d'HE de *Zingiber officinale* + 50% d'HE de *Rosmarinus officinalis* ;
3. 75% d'HE de *Zingiber officinale* + 25% d'HE de *Rosmarinus officinalis*.

Les résultats regroupés dans le tableau affiche que l'effet antibactérien varie selon la combinaison, les trois concentrations manifestent un effet indifférent envers *E.coli*, et un effet antagoniste envers *P.aeruginosa*, tandis que les mêmes concentrations exerce un effet synergique envers les deux autres souches gram+ qui sont résistantes à l'antibiotique CTX, cet effet est plus remarquable envers *B.cereus*.

3.2. Les résultats de la combinaison des huiles essentielles avec la nisine

3.2.1. Les résultats de la combinaison d'H.E de *Zingiber officinale* avec la nisine

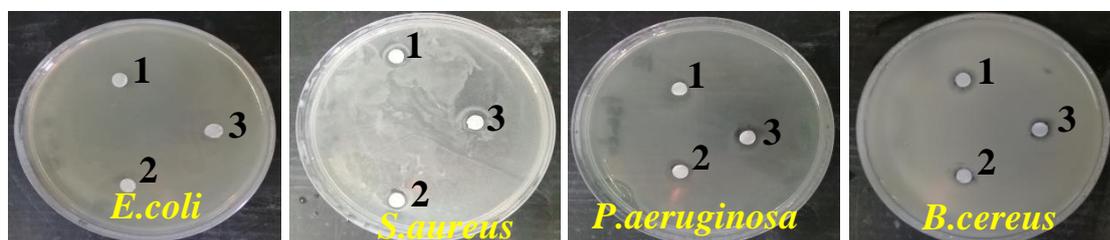


Figure 21 : Résultats de la combinaison d'HE *Zingiber officinale* et la nisine à trois concentrations différentes sur les quatre bactéries testées.

1. 25% d'huiles de gingembre +75% Nisine ;
2. 50% d'huiles de gingembre +50% Nisine ;
3. 75% d'huiles de gingembre +25% Nisine.

3.2.2. Les résultats de la combinaison d'H.E de *Rosmarinus officinalis* avec la nisine

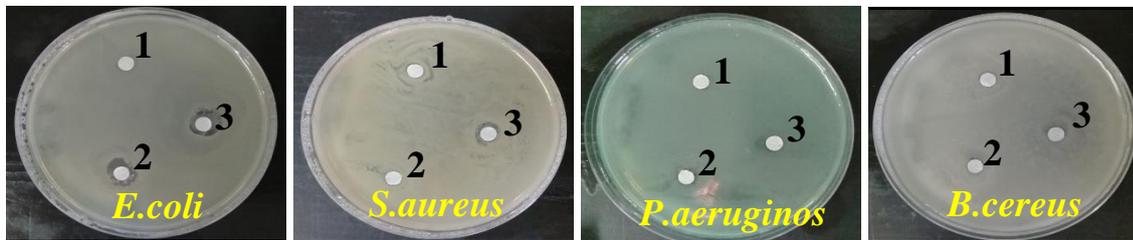


Figure 22 : Résultat de la combinaison d'HE de *Rosmarinus officinalis* et la nisine a trois concentrations différentes sur les quatre bactéries testées

1. 25% d'huiles de romarin +75% Nisine ;
2. 50% d'huiles de romarin +50% Nisine ;
3. 75% d'huiles de romarin +25% Nisine.

Le tableau suivant regroupe les diamètres des zones d'inhibition de la combinaison entre les deux huiles essentielles *Zingiber officinale*, *Rosmarinus officinalis* et la nisine et a trois concentration différentes sur les quatre bactéries testées

Tableau XIII : Tableau récapitulatif des résultats de la combinaison entre la nisine et les deux huiles essentielles à trois concentrations différentes sur les quatre bactéries testées.

		Diamètres d'inhibition en (mm) et en moyenne des deux essais \pm l'écart type					
Souche	<i>Zingiber officinale</i> +nisine			<i>Rosmarinus officinalis</i> +nisine			
	1	2	3	1	2	3	
<i>E.coli</i>	06,00 \pm 00,00	06,00 \pm 00,00	06,00 \pm 00,00	06,00 \pm 00,00	08,25 \pm 02,87	14,50 \pm 04,43	
<i>S.aureus</i>	07,75 \pm 02,06	07,25 \pm 01,50	07,75 \pm 00,95	06,00 \pm 00,00	06,00 \pm 00,00	07,50 \pm 01,91	
<i>P.aeruginosa</i>	12,25 \pm 00,95	10,00 \pm 00,81	09,75 \pm 00,50	06,00 \pm 00,00	06,00 \pm 00,00	06,00 \pm 00,00	
<i>B.cereus</i>	08,25 \pm 02,62	07,75 \pm 01,50	08,25 \pm 00,95	06,00 \pm 00,00	06,00 \pm 00,00	06,00 \pm 00,00	

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

1. 25% d'huile essentielle +75% de nisine ;
2. 50% d'huile essentielle +50% de nisine ;
3. 75% d'huile essentielle +25% de nisine.

D'après les résultats du tableau 13, la combinaison de la nisine avec les deux huiles essentielles à différentes concentrations révèlent des effets dissemblables envers les 4 souches testées. Les trois concentrations de la combinaison de l'huile *Zingiber officinale*+nisine exercent un effet indifférent vis-à-vis *S.aureus*, un effet antagoniste envers *E.coli*, alors qu'elle exerce un effet synergique vis-à-vis *P.aeruginosa* et *B.cereus*.

La combinaison 75% de *Rosmarinus officinalis* +25% de nisine a donné un effet synergique envers *E.coli*, un effet indifférent pour la concentration 50% de *Rosmarinus officinalis* +50% de nisine et un effet antagoniste pour 75% de *Rosmarinus officinalis* +25% de nisine. Citant également que les trois concentrations de la combinaison *Rosmarinus officinalis*+nisine ont eu un effet indifférent sur *S.aureus* et *B.cereus*, ainsi qu'un effet antagoniste envers *P.aeruginosa*. La combinaison 75% de *Rosmarinus officinalis* +25% de nisine a donné un effet synergique envers *E.coli*, un effet indifférent pour la concentration 50% de *Rosmarinus officinalis* +50% de nisine et un effet antagoniste pour 75% de *rosmarinus officinalis* +25% de nisine. Citant également que les trois concentrations de la combinaison *Rosmarinus officinalis*+nisine ont eu un effet indifférent sur *S.aureus* et *B.cereus*, ainsi qu'un effet antagoniste envers *P.aeruginosa*.

Les combinaisons réalisées dans notre étude est dans le but de déduire la présence des différents effets antibactériens (synergique, antagoniste, indifférent, additif) envers les quatre 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).

Les résultats portés dans les tableaux précédents, montrent que l'effet antibactérien varie selon la combinaison, la concentration et selon la souche bactérienne cible. La combinaison de d'H.E de *Zingiber officinale* et la nisine révèle un effet synergique sur la souche *P.aeruginosa* à trois concentrations différentes dans la plus importante est la concentration où la nisine a le pourcentage le plus élevé (25% d'H.E de *Zingiber officinale* + 75% de nisine). tandis que les deux autres combinaisons (*Rosmarinus officinalis*+nisine et *Zingiber officinale* +*Rosmarinus officinalis*) montrent un effet antagoniste. Dont l'HE de *Zingiber officinale* et nisine seuls exercent un effet antibactérien sur la souche *P.aeruginosa*, alors qu'une sensibilité à l'HE de *Rosmarinus officinalis* seul a été enregistrée sur la souche.

Les huiles essentielles de sept plantes médicinales récoltées au Maroc ne présentent aucun pouvoir antimicrobien sur *P.aeruginosa*, mais l'association des huiles, présente un effet

synergique important contre *P.aeruginosa* avec une activité bactéricide intéressante (Chebaibi *et al.* 2016).

La combinaison d'HE de *Rosmarinus officinalis* et la nisine manifeste trois effets sur *E.coli* (synergique, antagoniste et indifférent) cependant que la souche est sensible à la nisine seule et résistante aux deux huiles seuls.

L'analyse de la variance a montré que l'activité exercée par les deux huiles et la nisine sur les souches étudiées présentes de la différence hautement significative. Cette analyse a montré également que la sensibilité des quatre bactéries vis-à-vis des HEs et la nisine présente des différences hautement significatives (p value=0).

D'après les travaux de d'Ouedrhiri *et al.* (2017) sur la combinaison entre l'huile essentielle du géranium d'Egypte (*Pelargonium asperum*) et celle de la camomille sauvage (*Ormenis mixta*), un effet synergique a été détecté entre ces deux huiles essentielles qui pourraient s'expliquer par la capacité des monoterpènes et sesquiterpènes, qui sont les principaux composés de l'HE d'*O.mixta* d'intégrer et perturber la membrane cellulaire, et donc, Ils facilitent l'absorption des terpénoïdes actifs (citronellol, Geraniol, citronellyl ester et isomenthone).

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 opté à conclure qu'il y a une amélioration importante dans l'activité grâce aux combinaisons réalisées entre les HEs et les antibiotiques dont effet le plus marqué était avec *carica papayaa* associée aux différents antibiotiques, dont cette huile n'a exercé aucun effet antibactérien.

L'étude de l'effet antibactérien de l'association du vinaigre à l'HE a apporté une activité antimicrobienne qui due principalement au vinaigre Gul *et al.* (2012). Hindi (2013) a testé l'effet individuel et combiné de l'extrait aqueux d'*Allium sativum* et le vinaigre de pomme, l'association a permis une forte sensibilité de toutes les bactéries utilisées, alors que le vinaigre seul a montré une légère activité vis-à-vis de ces bactéries. Une autre étude de l'activité antibactérienne de l'HE en combinaison avec la nisine a été également réalisée par Arab *et al.* (2012), la combinaison 50 % HE d'*Urtica dioïca* et 50 % nisine a montré un effet synergétique vis-à-vis de *Klebsiella oxytoca*. Par contre, *S.aureus* et *E.coli* ont été indifférentes aux combinaisons 25 % HE de *Urtica dioïca* + 75 % nisine et 25 % HE de *Ruta tuberculata* + 75% nisine, respectivement.

Par ailleurs, la nisine et l'acide lactique agissent synergiquement sur *Ps.fluorescens* et *Staph. Hominis* isolées à partir des poissons (Stevens *et al.* 1991 ; Nykanen *et al.* 1998). Ces auteurs rapportent que la nisine inhibe la croissance des bactéries Gram- quand elles sont traitées simultanément avec l'agent chélateur EDTA.

D'autres travaux visent à tester l'activité antimicrobienne d'extrait de feuilles (extrait brut et oleuropéine) d'olivier en combinaison avec la nisine .la combinaison de la nisine avec l'extrait brut a amélioré la sensibilité de *S.aureus* et *E.coli* d'un diamètre de 15.33 à 37mm et 10 à 20mm respectivement. Ainsi, l'application de l'oleuropéine associée à la nisine a montré une forte sensibilité de *S.aureus* (35mm) et *E.coli* (32mm) comparée aux diamètres de l'oleuropeine seul.

4. Résultat de la Concentration Minimale Inhibitrice

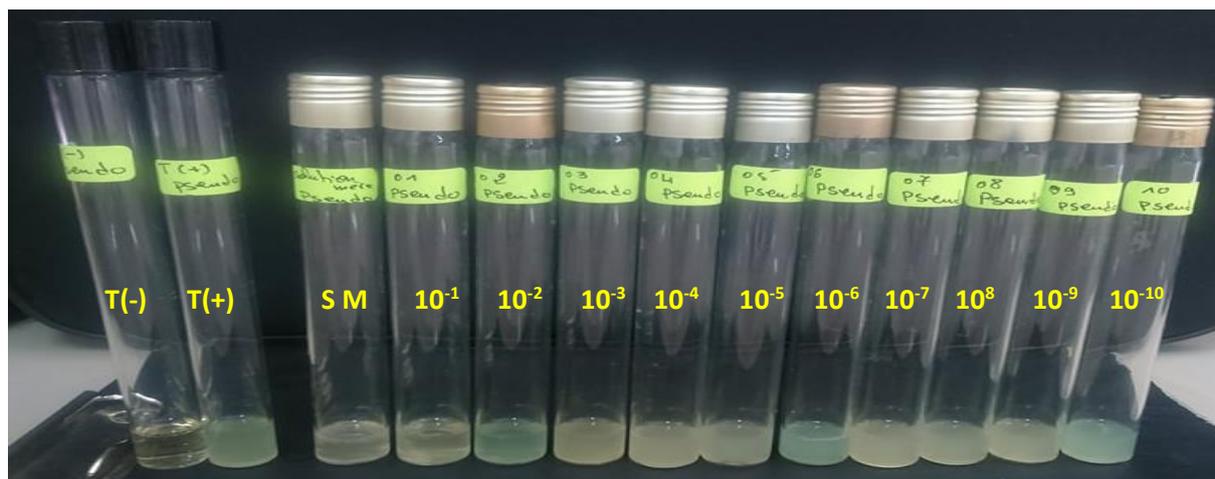


Figure 23 : Série de dilution réalisée afin de déterminer la CMI en milieu liquide de l'HE de *Rosmarinus officinalis* sur la souche *P.aeruginosa*.

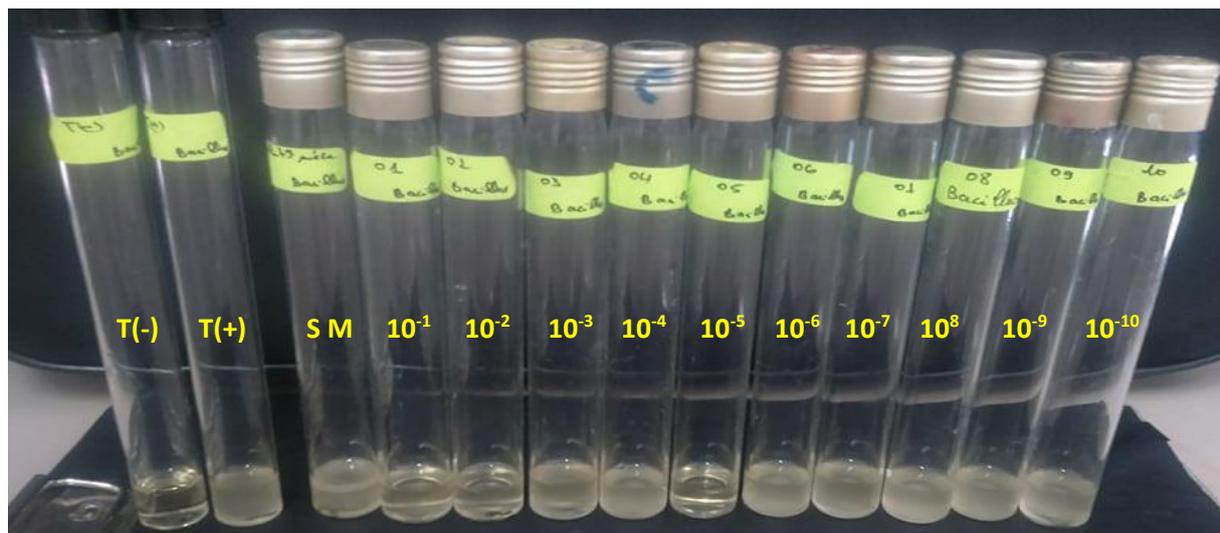


Figure 24 : Série de dilution réalisée afin de déterminer la CMI en milieu liquide de la combinaison de deux huiles a la concentration 75% d'H.E de *Zingiber officinale* +25% d'H.E de *Rosmarinus officinalis* sur la souche *B.cereus*.

La détermination de la concentration minimale inhibitrice de l'HE de *Rosmarinus officinalis* sur la souche *P.aeruginosa*.et combinaison l'HE de *Rosmarinus officinalis*+nisine a la concentration 75% d'H.E de *Zingiber officinale* +25% d'HE de *Rosmarinus officinalis* sur la souche *B.cereus* est effectuée par la méthode des dilutions en milieu liquide. C'est une technique quantitative qui permet de déterminer l'intervalle de concentrations qui inhibent effectivement la croissance bactérienne.

L'étude préliminaire in vitro cité dans les figures précédentes. Présente des résultats semblables qui se sont révélées très faiblement actives, l'HE de *Rosmarinus officinalis* n'a présenté aucun effet inhibiteur sur la croissance de la souche *P.aeruginosa* a la concentration utilisé de 56.25µl/ml, aussi pour combinaison de deux huiles a la concentration 75% d'H.E de *Zingiber officinale* +25% d'H.E de *Rosmarinus officinalis* sur la souche *B.cereus*.

Contrairement à nos résultats (Alzoreky et Nakahara, 2003), ont montré que *B. cereus* et *S.aureus* ont été les plus sensibles à toutes les plantes avec une valeur de CMI de 2460 µg/ml, *L. monocytogens* et *E.coli* montrent une résistance à toutes les plantes, à l'exception de *Cinnamomum cassia*, avec des CMI respectives de 1320 et de 2640 µg/ml. des résultats similaire ont été obtenues par d'autres études récentes de Ramtin *et al.* (2013) et Dia *et al.* (2013), ou ont constaté que les Gram positif sont plus sensibles que les Gram négatif.

Alors le résultat obtenu dans notre travail est du probablement à la non miscibilité des substances huileuses en milieu aqueux, ou une imperméabilité des huiles (hydrophobes) à travers les parois des bactéries à Gram positif.

En accord avec nos résultats les bactéries Gram négatif comme *E.coli* peuvent être sensible à des faibles concentrations des HEs (Derwich *et al.* 2009 ; Szwanu 2012 ; Chouitah *et al.* 2013).

5. Résultats de l'activité antifongique des deux huiles essentielle et la nisine

5.1 Résultats des témoins

Tableau XIV : Résultats des témoins positifs et négatifs des souches fongiques réalisées avec l'antifongique, DMSO et HCl pour l'activité antifongique de deux HEs (*Zingiber officinale*, *Rosmarinus officinalis*) et la nisine.

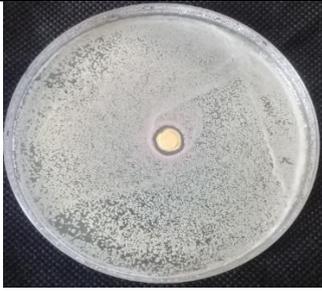
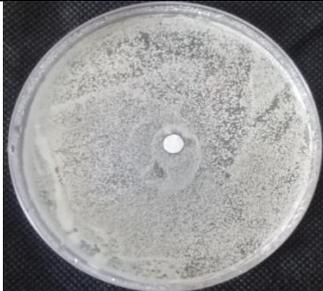
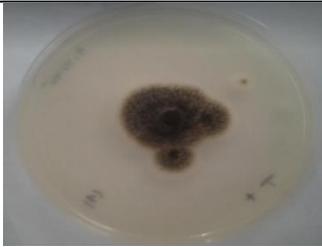
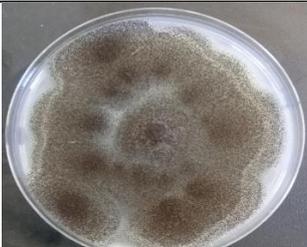
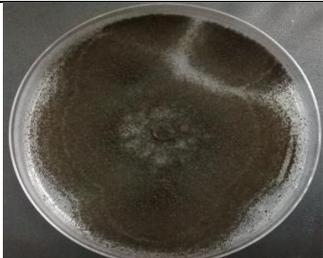
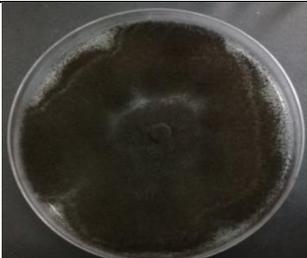
Témoins Souches	témoin positif (antifongique)	Témoins négatif		
		DMSO	HCl	
<i>Candida albicans</i>				
<i>Aspergillus niger</i>	2 ^{eme} jour			
	5 ^{eme} jour			

Tableau XV : Résultats des diamètres d'inhibition en mm (moyenne \pm l'écart type) des témoins positif et négatif de *Candidat albisans* et *Aspergillus niger*.

Souches		Témoins	témoin positif (antifongique)	Témoins négatif	
				DMSO	HCl
<i>Candidat albisans</i>			07,00 \pm 00,00	06,00 \pm 00.00	06,00 \pm 00.00
<i>Aspergillus niger</i>	2 ^{eme} jour		31,50 \pm 00,70	50,75 \pm 02,50	48,75 \pm 05,00
	5 ^{eme} jour		49,49 \pm 03.76	90,00 \pm 01,50	85,00 \pm 05,00

A partir de ces tableaux on constate que le DMSO et l'HCL n'exercent aucun effet sur les deux souches fongiques donc ce dernier est inerte vis-à-vis de l'activité antifongique.

5.2. Résultats de l'activité antifongique des deux huiles essentielles et nisine seules et en combinaisons

5.2.1. *Condita albicans*



Figure 25 : Résultat de test de sensibilités de la souche fongique *Condida albicans* avec l'huile essentielle de *Zingiber officinale*.



Figure 26 : Résultat de test de sensibilités de la souche fongique *Condita albicans* avec l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*.

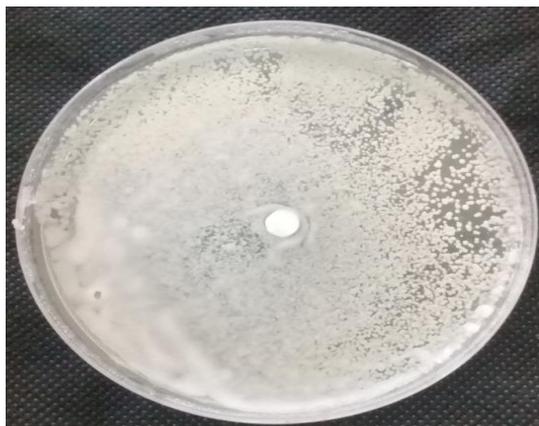


Figure 27 : Résultat de teste de sensibilité de *candida albicans* vis à vis la nisine.

Les diamètres des zones d'inhibition ainsi que la sensibilité de la souche fongique *candida albicans* avec les deux huiles essentielles et la nisine sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau XVI : Résultats des diamètres d'inhibition en mm (moyenne \pm l'écart type) de l'activité antifongique des deux huiles essentielles et la nisine vis-à-vis *candida albicans*.

Souche	<i>Zingiber officinal</i>	Sensibilité	<i>Rosmarinus officinalis.</i>	Sensibilité	Nisine	Sensibilité
<i>Candida albicans</i>	09,50 \pm 01,30	(+)	11,00 \pm 02,00	(+)	06,00 \pm 00,00	(-)

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

D'après les résultats précédents, seules les deux huiles essentielles présentent une activité antifongique sur *candidat* .une lège activité a été remarqué avec l'H.E de *Zingiber officinale* par apport à celle de *Rosmarinus officinalis* qui est plus prononcée avec un diamètre d'inhibition de 11mm.

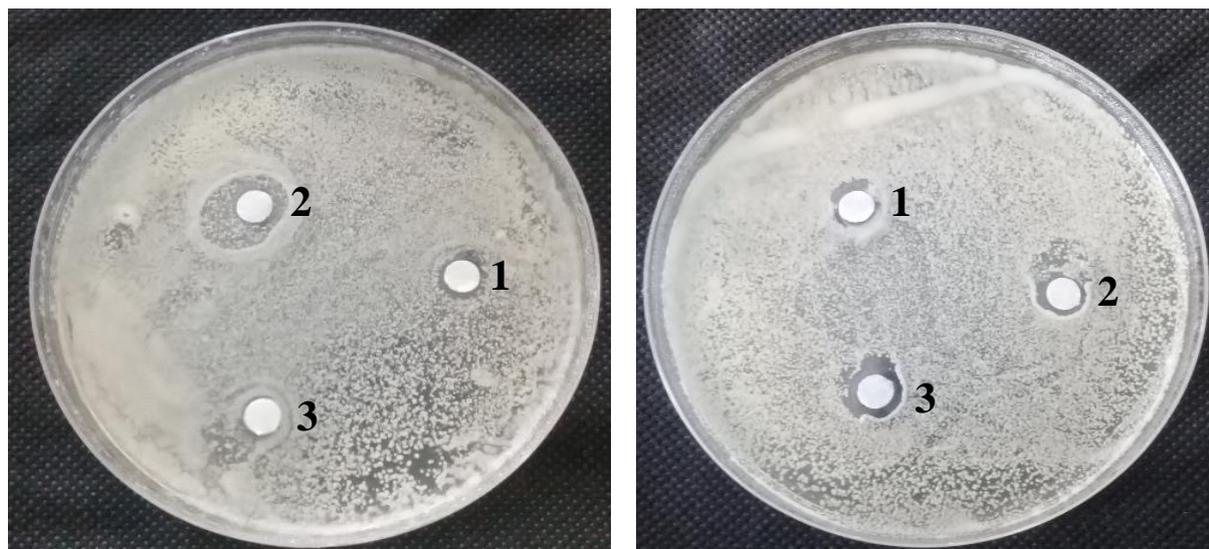


Figure 28 : Résultat de teste de sensibilité de *candida albicans* vis à vis les deux huiles *zingiber officinale* et *rosmarinus officinalis* en combinaison avec la *nisine* à différentes concentrations. (À droite *Zingiber officinale* + nisine, à gauche *Rosmarinus officinalis* + nisine).

1. 25% d’huile essentielle +75% de nisine ;
2. 50% d’huile essentielle +50% de nisine ;
3. 75% d’huile essentielle +25% de nisine.

Les diamètres d’inhibition de l’activité antifongique de la combinaison de deux huiles essentielles avec la nisine vis-à-vis *candida albicans*, sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau XVII : Résultats des diamètres d’inhibition en mm (moyenne \pm l’écart type) de l’activité antifongique de la combinaison de deux huiles essentielles avec la nisine vis-à-vis *Candida albicans*.

Souche	<i>Zingiber officinale</i> +nisine			<i>Rosmarinus officinalis</i> +nisine		
	1	2	3	1	2	3
<i>Condida albicans</i>	07,12 \pm 00,63	12,25 \pm 02,08	06,00 \pm 00,00	07,25 \pm 00,95	07,50 \pm 01,29	08,75 \pm 00,77

1. 25% d’huile essentielle +75% de nisine ;
2. 50% d’huile essentielle +50% de nisine ;
3. 75% d’huile essentielle +25% de nisine

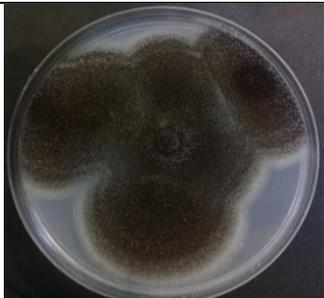
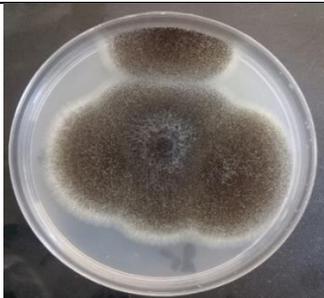
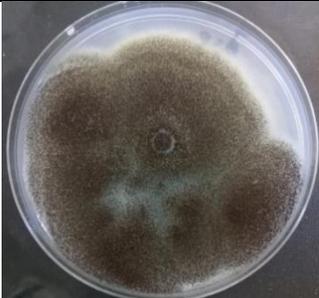
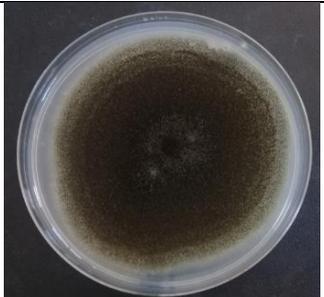
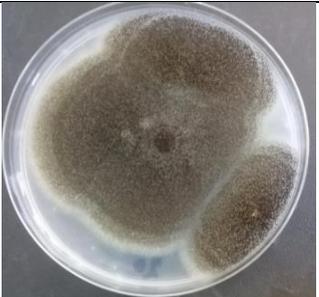
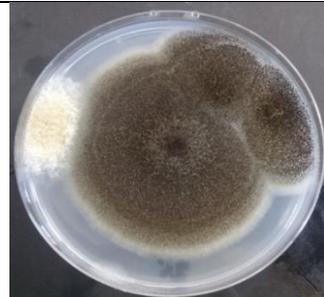
D’après la figure 31 et le tableau 15 seule la concentration 50% HE *Zingiber officinale* +50% de nisine a montré un effet synergique avec un diamètre de 12,25mm, contrairement aux

deux autres concentrations de la même combinaison et aux trois concentrations de la combinaison *Rosmarinus officinalis*+nisine ont signalé un effet antagoniste.

5.2.2 *Aspergillus niger*

Après incubation, les résultats de la lecture du 2^{ème}jour et du 5^{ème}jour de test de sensibilité d'*Aspergillus niger* avec les deux huiles et la nisine sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau XVIII : Les résultats de la lecture du 2^{ème}jour et du 5^{ème}jour de test de sensibilité d'*Aspergillus niger* vis-à-vis les deux huiles et la nisine à différentes concentrations (15 ; 20 ; 25).

Jour		Concentration 15	Concentration 20	Concentration 25
2 ^{ème} jour	<i>Zingiber officinale</i>			
	<i>Rosmarinus officinalis</i>			
	Nisine			

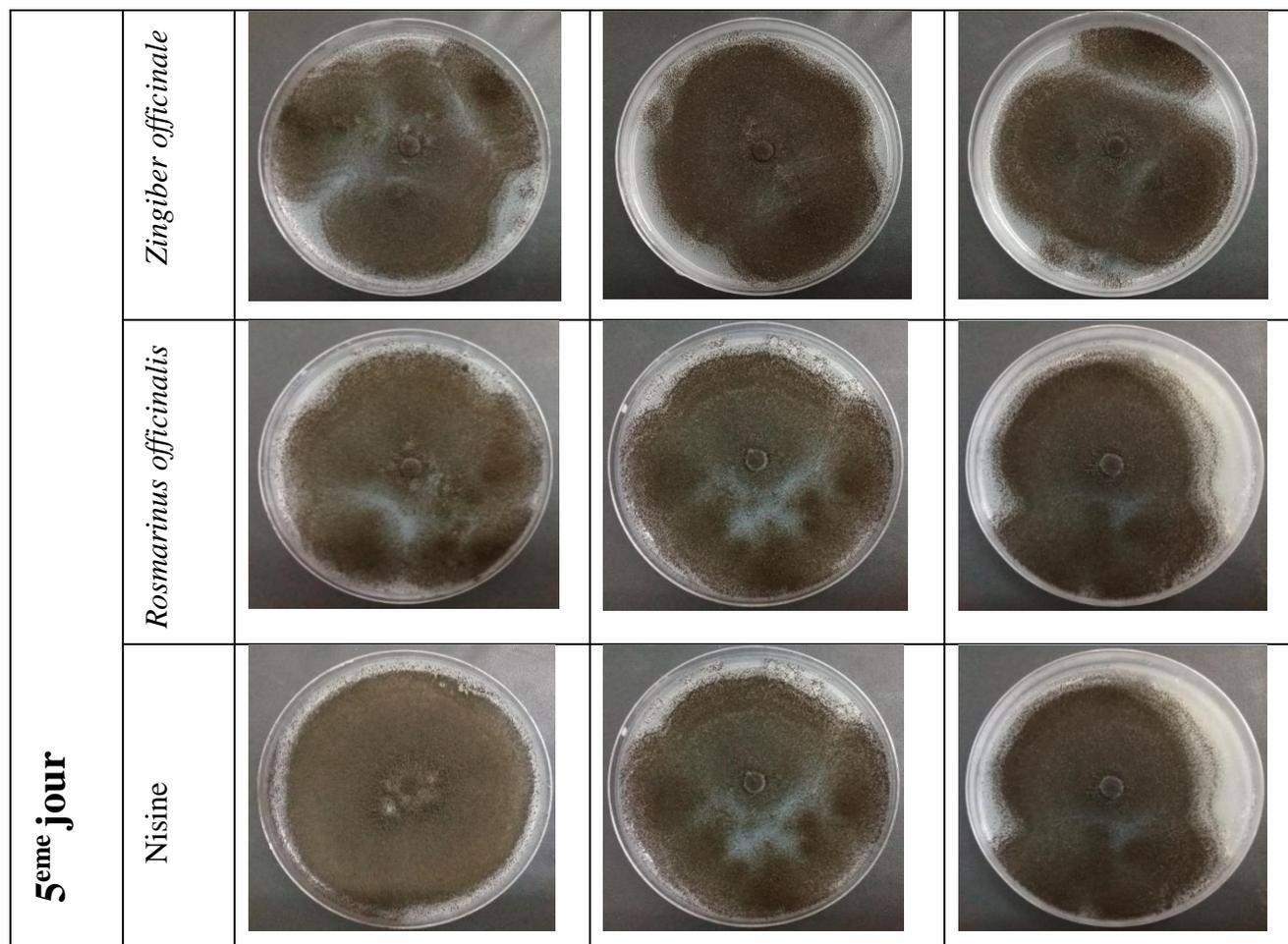


Tableau XIX : Résultats des diamètres de croissance en mm (moyenne \pm l'écart type) avec le calcul du taux d'inhibition de l'activité antifongique des deux l'HEs et nisine vis-à-vis *Aspergillus niger* à différentes concentration (15 ; 20 ; 25.).

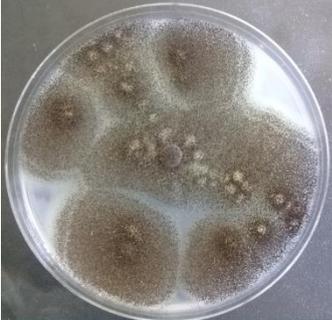
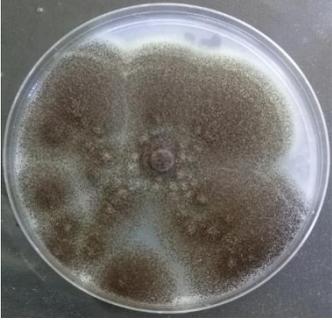
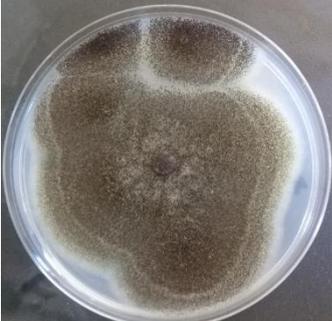
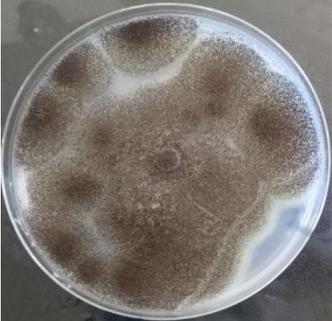
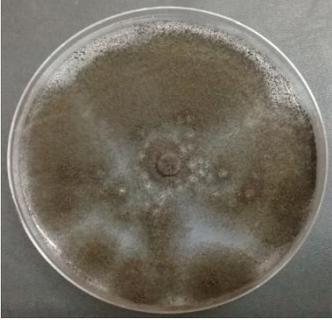
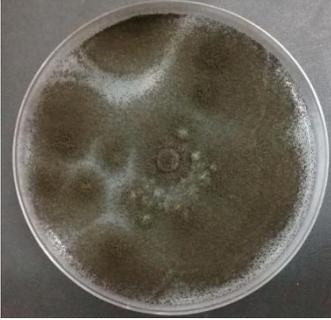
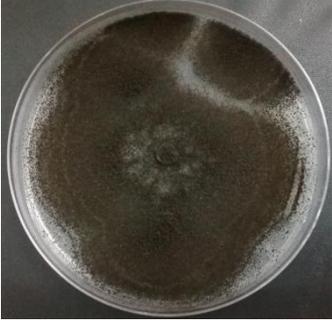
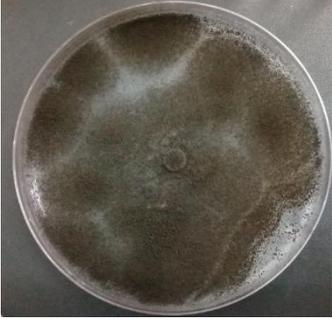
Jours		Concentration 15		Concentration 20		Concentration 25	
		diamètres	TI%	diamètres	TI%	diamètres	TI%
2 ^{ème} jour	<i>Zingiber officinale</i>	43,77 \pm 10,30	43,05	50,50 \pm 03,74	60,66	58,50 \pm 01,73	94,73
	<i>Rosmarinus officinalis</i>	51,75 \pm 05,90	71,05	51,50 \pm 08,35	70,17	54,00 \pm 07,65	80,35
	Nisine	50,75 \pm 11,58	65,54	43,25 \pm 13,12	41,22	49,50 \pm 13,27	63,15
5 ^{ème} jour	<i>Zingiber officinale</i>	46,75 \pm 02,50	05,53	65,75 \pm 06,84	34,97	60,75 \pm 05,50	24,22
	<i>Rosmarinus officinalis</i>	52,25 \pm 06,02	05,93	52,50 \pm 08,88	06,47	58,00 \pm 08,28	18,30
	nisine	71,25 \pm 06,23	46,80	49,75 \pm 11,41	00,55	56,00 \pm 12,19	14,00

1. 25% d'huile essentielle +75% de nisine ;
2. 50% d'huile essentielle +50% de nisine ;
3. 75% d'huile essentielle +25% de nisine.

D'après les tableaux présentés plus haut les résultats du suivi de croissance d'*Aspergillus niger* pendant cinq jours montrent que ce dernier est en augmentation ceci se traduit par la diminution du taux d'inhibition de la croissance qui est faible (00,55 à 46,80).ce qui explique la résistante de la souche. L'activité antifongique des deux HEs et la nisine dépend de la dose.

Les résultats de la lecture du 2^{eme}jour et du 5^{eme}jour de test de sensibilité d'*Aspergillus niger* vis-à-vis la combinaison des deux huiles et la nisine sont représenté dans le tableau suivant :

Tableau XX : les résultats de la lecture du 2^{eme}jour et du 5^{eme}jour de test de sensibilité d'*Aspergillus niger* vis-à-vis les deux huiles en combinaison avec la nisine à différentes concentrations (1 ; 2 ; 3).

jours		Concentration 1	Concentration 2	Concentration 3
2 ^{eme} jour	Zingiber officinale + Nisine			
	Rosmarinus officinalis + nisine			
5 ^{eme} jour	Zingiber officinale + nisine			
	Rosmarinus officinalis + nisine			

1. 25% d'huile essentielle +75% de nisine ;
2. 50% d'huile essentielle +50% de nisine ;
3. 75% d'huile essentielle +25% de nisine.

Tableau XXI : Résultats des diamètres de croissance en mm (moyenne \pm l'écart type) avec le calcul du taux d'inhibition de l'activité antifongique (*Aspergillus niger*) de deux huiles essentielles avec la nisine à différentes concentration (1, 2, 3).

Jours		Concentration 1		Concentration 2		Concentration 3	
		Diamètres	TI%	Diamètres	TI%	diamètres	TI%
2 ^{ème} jour	<i>Zingiber officinale</i> +nisine	41,26 \pm 02,62	54,24	55,75 \pm 04,34	85,08	55,75 \pm 06,13	85,08
	<i>Rosmarinus officinalis</i> +nisine	49,50 \pm 04,20	63,15	49,75 \pm 03,09	64,03	49,00 \pm 02,94	61,40
5 ^{ème} Jour	<i>Zingiber officinale</i> +nisine	43,00 \pm 04,24	24,23	61,00 \pm 03,16	24,75	59,5 \pm 02,08	21,53
	<i>Rosmarinus officinalis</i> +nisine	50,00 \pm 03,55	39,73	51,00 \pm 01,41	03,24	53,75 \pm 03,86	09,16

1. 25% d'huile essentielle +75% de nisine ;
2. 50% d'huile essentielle +50% de nisine ;
3. 75% d'huile essentielle +25% de nisine.

D'après les tableaux 18 et 19 la combinaison des deux huiles essentielles *Rosmarinus officinalis* et *Zingiber officinale* et la nisine présentent un effet indifférent à différentes concentrations vis-à-vis *Aspergillus niger*. Le suivi de la croissance d'*Aspergillus niger* pendant cinq jours à montrer que ce dernier est en augmentation ceci se traduit par la diminution du taux d'inhibition de la croissance.

Les résultats d'El mansouri (2013) issus des tests d'inhibitions des levures montrent que sur 37 extraits de plantes testés dont *Rosmarinus officinalis* et *Zingiber officinale*, Ont indiqué une grande activité antifongique sur *C.albicans*, reflétant l'importance de ces essences et c'est ce qu'il confirme nos résultats.

Une corrélation positive entre l'activité antifongique et la teneur en monoterpène a été déduite par l'étude de (Caccioni *et al.* 1998) qui sont reconnus comme de bon composés fongitoxiques (Snigh *et al.* 1980).

Jing *et al.* (2014) concluent que les huiles essentielles des citruses. Dont le limonène constitue le composant majoritaire (31.8.% à 96.62%), sont efficaces dans l'inhibition de la croissance mycélienne. La production des spores et la réduction de mycotoxines produite par les espèces *Aspergillus niger*, *A.flavus*, *A.fumigatus* et *A.terreus*. Le pouvoir inhibiteur des huiles essentielles sur la sporulation a été rapporté par plusieurs auteurs (Sharma et Tripathi. 2006.2008 ; Mahanta *et al.* 2007 ; Chutia *et al.* 2009 ; Grbic *et al.* 2011 Philip *et al.* 2012).

D'après plusieurs études de l'activité antifongique *in vitro*, La variabilité des résultats qui peut exister entre ces différentes études est probablement due à l'influence de plusieurs facteurs tels que la méthodologie, Les microorganismes testés et les huiles essentielles utilisées, ainsi que bien d'autres facteurs comme la variabilité de la composition chimique des HEs.



Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Notre étude a porté sur l'activité antimicrobienne de deux huiles essentielles *Zingiber officinale* et *Rosmarinus officinalis* avec la nisine.

Les résultats indiquent que les deux huiles essentielles n'exercent aucune activité sur les souches (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*) testées à l'exception du *Rosmarinus officinalis* qui a montré une activité sur *P.aeruginosa*. L'étude de l'activité antibactérienne de la nisine contre les quatre bactéries citées ci-dessus nous a conduit à des résultats insignifiants pour *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus cereus* mais aussi une activité plus au moins marquée vis-à-vis *Escherichia coli*. Les deux HEs exercent une activité antifongique vis-à-vis *candidat albicans* et aucune activité envers *Aspergillus niger*, cependant la nisine ne présente aucune activité envers les deux souches fongiques.

Une étude plus poussée de l'activité antimicrobienne qui porte sur la combinaison de deux huiles essentielles a présenté un effet synergique vis-à-vis *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*, un effet indifférent envers *Escherichia coli* et un effet antagoniste envers *P.aeruginosa*. Ainsi que la combinaison des huiles avec la nisine montrent des effets dissemblables envers les différentes souches testées avec un effet synergique classé important à la concentration 75% d'HE *Rosmarinus officinalis* + 25% de nisine vis-à-vis de *Bacillus cereus*. La combinaison 50% *Zingiber officinale* + 50% de la nisine présente un effet synergique vis-à-vis *candidat albicans*. Les combinaisons des deux HEs *Zingiber officinale* et *Rosmarinus officinalis* avec la nisine montrent un effet antagoniste envers la souche fongique *aspergillus niger*.

D'après ces résultats, on peut conclure que les combinaisons des huiles essentielles et la nisine ont un effet plus considérable que leurs utilisations seules vis-à-vis les bactéries.

A la lumière des résultats obtenus, il serait donc important d'explorer d'autres voies de recherche sur ces plantes intéressantes afin de mettre en évidence leurs éventuelles propriétés antibactériennes :

- Il serait souhaitable de réaliser l'étude du pouvoir antibactérien des huiles essentielles de ces plantes, déterminer leurs compositions chimiques, et identifier les principaux actifs.

- Il serait aussi intéressant d'élargir l'éventail des espèces microbiennes testées (bactéries, levures et moisissures, hospitalières et de référence), et faire des associations de ces huiles avec d'autres agents antibactériens pour voir d'éventuels effets synergiques.



Références bibliographiques

AFNOR. (1982). AFNOR NF T 75-006 Association Française de Normalisation : Huiles essentielles NF T 75.

AFSSAPS, Mai (2008). Agence Française de Sécurité Sanitaire des produits de santé : Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles. Contribution pour l'évaluation de la sécurité des produits cosmétiques contenant des huiles essentielles.

Al-Bayati. A. F., Khudir D. S. (2007). In vitro activité antimicrobienne de salvadora persica L. *Université de Mossoul. Irak*, 57-62.

Aruoma OI., Spencer JPE., Rossi R., Aeschbach R., Khan A., Mahmood N., Munoz A., Murcia A., Butler J., Halliwell B. (2008). An evaluation of the antioxidant and antiviral action of extracts of rosemary and provencal herbs. *Food Chem Toxicol*, 134 :449–456(1996).Au laboratoire, RivistaIta/lianaEPPOS, Numero spécial, 306-325

Avlessi F. (2012). Chemical composition and Biological activities of the Essential oil extracted from the Fresh leaves of Chromolaena odorata (L. Robinson) growing in Benin. *ISCA Journal of Biological Sciences*, 1(3): 7-13.

Bakkali. F., Averbeck S., Averbeck D. et Idaomar M. (2008). Biological effects of essential oils – A review ; *Food and Chemical Toxicology* 46 (2008) 446–475 Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermo-mécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. Thèse de doctorat.

Baser K. H., Tümen G., Tabanca N. et Demirci F. (2001). Composition and antibacterial activity of the essential oils from Satureja wiedemanniana (Lallem.). *Velen. Z. Naturforsch*, 56: 731-738.

Bassoulé I.H.N., Juliani H.R. (2012). Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules Review*, 17: 3989-4006.

Bedi G., Tonzibo Z.F., Chopard C. & N'Guessan Y.T. (2004). Etude des effets antidouleur des huiles essentielles de Chromolaena odorata et de Mikania cordata, par action sur la Lipoxigenase L-1 de soja. *Physical Chemical News*, 15 : 124-127.

Bedi G., Tonzibo Z.F., Oussou K.R., Chopard C., Mahy J.P. & N'Guessan Y.T. (2010). Effect of essential oil of Chromolaena odorata (Asteracea) from Ivory Coast, on cyclooxygenase function of prostaglandine-H synthase activity. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 4(8) : 535-538.

Belakhdar, J. (1997). La pharmacopée marocaine traditionnelle. *Idis PRESS (Ed). Paris, 764.*

Belhadj Salah-Fatnassi. K., Slim-Bannour A., Aouni M., Harzallah-Skhiri F., Mahdjoub M.A., Mighri Z. et Chaumont J.P. (2010). Activité antivirale et antioxydante in vitro d'huiles essentielles de *Thymus capitatus* (L.) Hoffmans & link de Tunisie. *Acta Botanica Gallica.*, 157(3) : 433-444.

Béliveau R et Gingras D. (2005). Les aliments contre le cancer. *Édition du Trécarré. Outremont, 213.*

Belkou h, beyoud f. et taleb bahmed z. (2005). Approche de la composition biochimique de la menthe vert (*Mentha spicata* L) dans la région de ouargla, mémoire DES, *univ ouargla.* 2-61.

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

Boullard., Boudjemaa Nour Elyakin et Ben Guegua Hadjer. (2006). L'effet antibactérien de *Nigella Sativa*. *Université Kasdi Merbah Ouargla.*

Braga M.E.M., Moreschi S.R.M., Meireles M.A.A. (2006). Effects of Supercritical Fluid Extraction on *Curcuma longa* L. and *Zingiber officinale* R. *Starches, Carbohydrate Polymers,* 63: 340-346.

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

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

Bruneton J. (1999). Pharmacognosie, phytochimie. Plantes médicinales, *3^{ème} édition, Paris : Editions médicales internationales, Tec et Doc, Lavoisier, 1120.*

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

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

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

Chalchat J.K., Carry L. P., Menut C., Lamaty G., Malhuret R. and Chopineau J. (1997). Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. VI- Activity of some African essential oils. *J. Essent. Oil Res*, 9 : 67-75.

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

Chatterjee.P.K. (2006). Intracellular Gene Expression Profile of *Listeria monocytogenes*, *Infection and Immunity*, 74 : 1323-1338.

Chebaibi A., Marouf Z., Rhazi-Filali F., Fahim M. et Ed-dra A. (2016). Evaluation du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de sept plantes médicinales récoltées au Maroc. *Phytothérapie*, 6(14) : 355-362.

Chiasson H., Beloin N. (2007). Les huiles essentielles, des biopesticides «nouveau genre». *Revue de littérature*, 1(14) : 3-6.

Chouitah o., Meddah b., Aous A., Sonnet P. (2013). Chemical composition and antimicrobial activities of the essential oil of wild algerien *Marrubium Vulgare* L. *World journal of pharmaceutical research*, 2 : 909-916.

Coste H. (1937). Flore descriptive et illustrée de la France de la Corse et des contrées limitrophes. *Second Tirage, Paris - Librairie des Sciences et des Arts*, 807.

Croteau R., Kutchan T.M. et Lewis N.G. (2000). Natural Products (Secondary Metabolites). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, 24: 1250-1319.

Croteau, R. (1986). "Biochemistry of monoterpenes and sesquiterpenes of the essential oils. Herbs, spices and medicinal plants", Recent avances in Botany, *Horticulture and Phamacology*, Vol. 1, Craker, Simon, Oryx press, phoenix.

Daoudi L. (2000). Purification, développement d'anticorps monoclonaux spécifiques et détection immunoenzymatique de la nisine Z, une bactériocine produite par *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *Diacetylactis* UL 719 .*mémoire pour l'obtention du grade de maître ès science (MSc.) à l'université Laval, Canada.*

Deans S.G. & Ritchie G. (1987). Antibacterial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology* 5, 165-180.

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

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

Derwich E., Benziane Z., Boukir A. (2009). GC/MC Analysis of volatiles constituent and Antibacterial Activity of the essential oil of leaves of *Eucalyptus globulus* in Atlas Median from Morocco. *Advances in Natural and Applied Sciences*, 3(3) : 305-313.

Djenane D., Sanchez-Escalante A., Beltran J.A., Roncales P. (2001). Ability of α – tocopherol, taurine and rosmarinic acid, in combination with vitamin C, to increase the oxidative stability of beet steak packaged in modified atmosphere, *food chemistry*, 76 : 407-415.

Dorman H.J. & Deans S.G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antimicrobial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 308-316.

Drider J., Prevost H. (2009). Bactéries lactiques. Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications industrielles. Ed. *Economica., Paris*, 99 - 120.

Evenari, M. (1949). Germination inhibitors, *Bot. Rev.*, 15 - 153.

Faivre Cl, Lejeune R, Staub H, Goetz P. (2006). Zingiber officinale Roscoe. *Phytothérapie*, 4(2) : 99-102.

Ferhat. (2009). Recherche des substances bioactives de *Leptocarpus centaurea microcarpa* Coss et Dur. le diplôme des études supérieures en biologie (DES). Université Mohamed Boudiaf M'sila. Faculté des sciences et des sciences de l'ingénierie. Département biologie.

Fischer, N. L. (1986). The function of mono and sesquiterpenes as plant germination and growth regulators. In Putman, A. and Tang, C.S. (Eds), *The Science of Allelopathy*, John Wiley and Sons, Inc. *New York*, 203-218.

Franchomme, P. Pénéol, D. (1990). L'aromathérapie exactement. *Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles*. Roger Jallois éditeur. *Limoges*, 445.

- Gabriel I., Alleman F., Dufoureq V., Perrin F. et Gabarrou J.F. (2013).** Utilisation des huiles essentielles en alimentation des volailles. 2. Hypothèses sur les modes d'action impliqués dans les effets observés. *INRA Productions Animales*, 26(1) : 13-24.
- Gigon F. (2012).** Le gingembre, une épice contre la nausée. *Phytothérapie*, 10(2) :87-91.
- Gonzalez-Trujano et al (2007).** Evaluation of antioiceptive effet.
- Grosjean N. (2008).** Huiles essentielles. Se soigner par l'aromathérapie. Ed. *Eyrolles pratique, paris*, 145.
- Grysole J. (2005).** Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation - *Manuel pratique*, 140-162.
- Gul F., Shinwari Z., Imiran A. (2012).** Screening of indigenous knowledge of herbal remedies for skin diseases among local communities of northwestern Punjab, Pakistan. *Journal of Botany*, 44(5) : 1609-1616.
- Hamdani F.Z., Allem R. (2015).** Proprieties antifongiques des huiles essentielles des feuilles de Citrus vis-à-vis d'*Alternaria alternata* et *Penicillium* sp in vitro. *Phototherapies*, 3: 1-4
- Hammer K.A., Carson C.F. & Riley T.V. (1999).** Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts, *Journal of Applied Microbiology*, 86: 985–990.
- Heath H.B. (1981).** Source Book of Flavours. *Westport: Avi*, 890.
- Henrich. (2006).** Ethnobotany and Flavonoids-potent and versatile
- Hindi N.K.K. (2013).**In-vitro Antibacterial Activity of aquatic Garlic Extract, Apple vinegar and Apple vinegar-Garlic Extract combinaison. *American journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*, 2321-2748.
- Hirsch A. & Grinsted E. (1951).** The differentiation of the lactic streptococci and their antibodies. *Journal of Dairy Research*, 18 : 198-204.
- Hurst A. (1981).** Nisin. *Advances in Applied Microbiology*, 27 : 85–123.
- Jack R.W., Tagg J.R., Ray B. (1995).** Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev*, 59 : 171-20.
- Kalemba D. & Kunicka A. (2003).** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10 : 813-829

Kalpna R., Chanda S. (2012). In-vitro interaction of certain antimicrobial agents in combination with plant extracts against some pathogenic bacterial strains. *Asians pacific journal of Tropical of Biomedicine*, 1466-1470.

Khaddor M, Tantaoui-Elaraki A, Benhadjiba A, et al (2003). Destruction de l'aflatoxine par les bactéries lactiques du "LBEN" marocain et du yaourt. *Bull Soc Pharm Bordeaux*, 142:101-12.

Klaenhammer T .R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70: 337-349

Klaenhammer T. (1993). Review *FEMS. Microbiologie*, 12 : 39-85.

Kurkin, V.A. (2003). Phenylpropanoids from medicinal plants. Distribution, classification, structural analysis and biological activity. *Chem. Nat. Compd.* 39 :123-153

Lobstein, A. ; Frey, M.L. et Anton, R. (1983). Altérations et conservation des huiles essentielles, *Ann. Pharm. Franç*, 41 (1) :69-75.

Lucchesi M.E. (2005). Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles. *Thèse de doctorat, université de la Réunion, France.*

Maach A. et Jemali A. (1986). Etude des caractéristiques physico-chimiques des HEs de deux plantes aromatiques cultivées au Maroc : Menthe Naa Naa abdi, Coriande. *IA V Hassan II, Rabat, Maroc.*

Malu S.P, Obochi G.O, Tawo et nyong B.E. (2009). Antibacterial activity and medicinal properties of ginger (*zingiber officinale*). *Global journal of pure and applied sciences vol 15, no. 3, 2009: 365-368 copyright© bachudo science co. ltd printed in nigeria. issn 1118-057.*

Mann C.M., Cox S.D. & Markham J.L. (2000). The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749 contributes to its tolerance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Tea tree oil). *Letters in Applied Microbiology*, 30: 294-297.

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

Nes I.F., Diep D.B., Havarstein L.S., Brurberg M.B., Eijsink V., Holo H. (1996). Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70 : 2-4, 113-28.

Norme AFNOR NF T 75-001. (1996). AFNOR. Huiles essentielles. Echantillonnage et méthodes d'analyse (Tome 1) – Monographies relatives aux huiles essentielles (Tome 2. Volumes 1 et 2). Mars 2000.

Ouedrhiri W., Balouiri M., Bouhdid S., Hark E.H., Moja S. et Greche H. (2017). Antioxydant and antibacterial activities of *Pelargonium asperum* et *Ormenis mixta* essential oils and their synergistic antibacterial effect. *Environmental Science and Pollution Research*: 1-8.

Ouelhadj A., Beddak k., Djenane D. (2011). Chemil composition and antifungal activity of the *Myrtus communis* and *Pistacia* essential oils of mediterranean regions in laboratory medium and strawberry fruit. In: *proceedings of the 24th International syposium on essential oils. Journal of essential Oil Research*.

Ouelhadj. A., Ait Salem. L., Djenane. D. (2017). Antibacterial Activity of *Pelargonium x asperum* Essential Oil and its Potential Synergy with Nisin. © Lavoisier SAS.

Oussou K.R. (2009). Etude chimique et activité biologiques des huiles essentielles de sept plantes aromatiques de la pharmacopée Ivoirienne. *Doctorat de l'Université de Cocody-Abidjan*, 241.

Padrimi F., Lucheromi M.T. (1998). Les huiles essentielles pour retrouver la vitalité, le bien-être, la beauté *Ed. Edition de vecchi*, 95.

Piochon M. (2008). Etude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore Laurentienne : composition chimique, activités pharmacologiques et hémi-synthèse. *Mémoire, Université de Québec à Chicoutimi, Canada*.

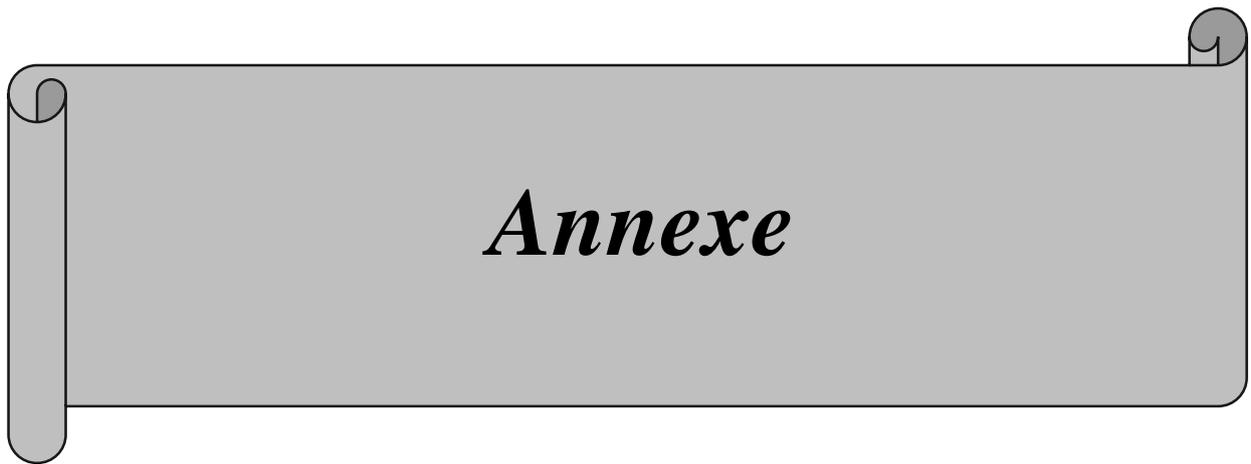
Ponce A.G., Fritz R., Del valle C., Cavaleiro C. et Salgueiro L. (2009). Antifungal activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Leben-Wissen and technology*, 36 : 679-684.

Quezel P., Santa S. (1963). Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II, *CNRS, Paris*, (1963) : 600.

- Rauter A.P., Branco I., Tostao Z., Pais M.S., Gonzalez A.G et Bermejo J.B. (1989).** Flavonoids from *Artemisia campestris* Subsp *Maritima*. *Phytochemistry*, 28 (8): 2173-2175.
- Ramtin M., Alreza M., Khoshkholgh-Pahlaviani M., Issazadeh K., Assmar M., Richard, H. (1992).** Épices et Aromates. *Technologie et Documentation Lavoisier. Paris*, 339.
- Richardh.M.J et Etievantp. (1997).** Représentativité des extraits d'arômes réalisés
- Sahl H.G., Bierbaum G. (1998).** *Lantibiotics*: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from Gram-positive, 52: 41-79.
- Sakkas H., Papadopoulou C. (2017).** Antimicrobial activity of basil, oregano and thyme essential oils. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(3) : 429-438.
- Salle, J. L. (1991).** Les huiles essentielles, synthèse d'arômes et introduction à la sympathicothérapie. *Ed. Frison-Roche, Paris*.
- Sangwan, N. S., Farooqi, A. H. A., Shabih, F., & Sangwan, R. S. (2001).** Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation*, 34: 3-21.
- Sipailiene A., Venskutonis P.R., Baranauskiene R. & Sarkinas A. (2006).** Antimicrobial Activity of commercial samples of thyme and marjoram oils. *Journal of Essential Oil Research*, 18 : 698-703
- Spencer, G.F, Wolf, R.B et Weisler, D. (1984).** 1. *Nat. Pro*, 47: 730-732.
- Stevens KA., Sheldon B.W., Klapes NA., Klaenhammer TR. (1991).** Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other Gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol*, 57: 3613-3615.
- Stipanovic, R.D., Williams, H.J. and Smith, L.A. (1986).** *ACS symp. Ser*, 296 : 79-94.
- Teuscher E., Anton R. et Lobstein A. (2005).** Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles. *Tec et Doc éditions, Paris*.
- Tuneli A., Delves-Broughton J. (1998).** International acceptance of nisin as a food preservative. *Int. Dairy. Fed. Bull*, 329: 20-23.
- Vidijasagar G.M., Nuzhat T. (2013).** Antifungal investigation on plant essential oils. A review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, 2(5) : 19-28.

Zarrabi s. (2013).In-vitro Antimicrobial Activity of *Iris pseudocorus* and *urtica dioica*. *Zohem Journal of Research in Medical Sciences*.

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



Annexe

Annexe I : Composition des solutions et des milieux de culture utilisés

✓ Eau physiologique stérile

Composition en g/l :

Chlorure de sodium (NaCl) 9g

Eau distillée 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/15 min

✓ Gélose Mueller Hinton (MH)

Composition en g/l :

Extrait de viande 3g

Hydrolysate acide de caséine 17,5g

Agar 18g pH=7,4

Stérilisation à 120°C/15 min.

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

Composition en g/ml

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

pH=7,4

Stérilisation à 120°C/15 min.

✓ **Potato Dextrose Agar (PDA)**

Composition en g/ml

Pomme de terre	200g
Dextrose	15g
Agar	20g
Eau distillée	1000ml

Stérilisation à 120°C/15 min.

✓ **Nisine**

Composition en g/ml

HCL (0.02N).....	100ml
Poudre de nisine.....	0.15g

Annexe III : Résultats du test statistique

```
data: zone and souche
F = 22.1675, num df = 52, denom df = 52, p-value < 2.2e-16
alternative hypothesis: true ratio of variances is not equal to 1
95 percent confidence interval:
 12.79466 38.40656
sample estimates:
ratio of variances
      22.16752
```

Figure I : Résultat de l'analyse de la variance de la combinaison des deux HEs (*Zingiber officinale* + *Rosmarinus officinalis*).

```
data: zone and souche
F = 22.1675, num df = 52, denom df = 52, p-value < 2.2e-16
alternative hypothesis: true ratio of variances is not equal to 1
95 percent confidence interval:
 12.79466 38.40656
sample estimates:
ratio of variances
      22.16752
```

Figure II : Résultat de l'analyse de la variance de la combinaison de l'huile de *Zingiber officinale* avec la nisine.

```
F test to compare two variances

data: zone and souche
F = 5.5144, num df = 52, denom df = 52, p-value = 6.365e-09
alternative hypothesis: true ratio of variances is not equal to 1
95 percent confidence interval:
 3.182822 9.554085
sample estimates:
ratio of variances
      5.514431
```

Figure III : Résultat de l'analyse de la variance de la combinaison de l'huile de *rosmarinus officinalis* avec la nisine.